

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



**FACTORES CONDICIONANTES DE LA VIABILIDAD
DEL INJERTO EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO
HUMANO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Luis Olmedilla Arnal

Bajo la dirección de los Doctores:

Paloma Martín Sanz
Santos Barrigón Vázquez
Lisardo Boscá Gomar

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2128-1

ÍNDICE

ÍNDICE

<u>I.- INTRODUCCIÓN</u>	8
<u>A.- EVOLUCIÓN HISTÓRICA</u>	8
<u>B.- INDICACIONES DEL TRASPLANTE HEPÁTICO</u>	11
<u>C.- CONTRAINDICACIONES DEL TH</u>	14
<u>D.- ALTERACIONES HEMODINÁMICAS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO</u>	15
<u>D.1 REPERFUSIÓN DEL INJERTO</u>	16
- D.1.A Génesis del SRP.....	17
- Factor paciente.....	17
- Factor cardiocirculatorio.....	18
- Factor reflejo.....	19
- Factor quirúrgico.....	20
- Factor metabólico.....	21
<u>E.- LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA</u>	24
<u>E.1.- CONCEPTO</u>	24
- Factores que actúan en el donante.....	25
- Preservación hasta el implante.....	25
- Variables en la técnica quirúrgica y factores que actúan en el receptor tras la reperfusión.....	26
<u>E.2.- FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN IR</u>	28
<u>E.2.A.- FACTORES ENDÓGENOS IMPLICADOS</u>	33

<u>E.2.A.1.- Óxido nítrico</u>	33
BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO.....	36
- Localización de la NOS.....	40
- Regulación transcripcional.....	41
FUNCIÓN DEL NO.....	42
ANTAGONISTAS DEL SISTEMA DEL NO.....	44
<u>E.2.B.- NO Y LESIÓN IR</u>	46
NO Y LESIÓN IR EN HUMANOS.....	52
<u>HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</u>	56
<u>II.- OBJETIVOS</u>	57
<u>III.- PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS</u>	59
<u>III.A.- PACIENTES</u>	59
<u>III.A.1.- Criterios de inclusión y exclusión</u>	59
<u>III.B.- ANIMALES</u>	61
<u>III.C.- MATERIAL</u>	62
<u>III.C.1.- Aparatos</u>	62
<u>III.C.2.- Fármacos y reactivos</u>	64
<u>III.D.- MÉTODOS</u>	65
<u>III.D.1.- TRASPLANTE ORTOTÓPICO DE HÍGADO EN EL</u>	

<u>HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN</u>	65
<u>III.D.1.a.- Donante</u>	65
<u>III.D.1.b.- Receptor</u>	66
- Monitorización.....	66
- Anestesia.....	66
- Cirugía.....	68
- Toma de muestras biológicas.....	70
<u>III.D.2.- TÉCNICAS ANALÍTICAS</u>	71
<u>III.D.2.a.- Análisis de la síntesis del NO en el TH</u>	71
<u>III.D.2.a1.- Determinación de los niveles de ARNm de la iNOS en las biopsias del injerto y en los cultivos de macrófagos</u>	71
<u>III.D.2.a2.- Determinación de los niveles de iNOS proteína por Western blot</u>	74
<u>III.D.2.a3.- Análisis de derivados del NO en el lavado del injerto</u>	76
<u>III.D.2.a4.- Estudio de la acción sobre el sistema de la NOS de las diferentes muestras tomadas del paciente</u>	77
- Efecto sobre la eNOs.....	77
- Efectos sobre la iNOs.....	78
<i>Preparación de los macrófagos</i>	78
<i>Análisis de la actividad arginasa y</i>	

<i>concentraciones de arginina</i>	80
<i>Determinación de la concentración de</i> <i>proteínas</i>	81
<u>III.D.2.a5.-Estudios con cromatografía líquida de</u> <u>alta resolución (HPLC)</u>	82
<u>III.D.2.a6.- Espectrometría de masas</u>	83
<u>III.D.2.b.- Formación de MMA y ADMA en</u> <u>hepatocitos</u>	84
<u>III.D.2.b1.- Cultivos de hepatocitos de rata</u> <u>adulta</u>	84
<u>III.D.3.- ANÁLISIS DE LOS DATOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</u> ..	85
<u>IV.- RESULTADOS</u>	87
<u>IV.A.- RESULTADOS CLÍNICOS</u>	87
<u>IV.A.1.- Donantes</u>	87
<u>IV.A.2.- Pacientes receptores</u>	87
<u>IV.B.- TÉCNICAS ANALÍTICAS</u>	89
<u>IV.B.1.- Análisis de la síntesis del NO en el TH</u>	89
<u>IV.B.1.a.- Análisis de los niveles de ARNm de la iNOS</u> <u>en las biopsias del injerto</u>	89

<u>IV.B.1.b.- Análisis de derivados del NO en el lavado del injerto.....</u>	90
<u>IV.B.1.c.- Estudio de la acción sobre el sistema de la NOS de las diferentes muestras tomadas del paciente.....</u>	90
IV.B.1.c1.- Efecto sobre la eNOS.....	90
IV.B.1.c2.- Efectos sobre la iNOS.....	94
IV.B.1.c2.a.- Producción de nitritos en los cultivos de macrófagos peritoneales.....	94
IV.B.1.c2.b.- Análisis de la reversibilidad de la inhibición de la iNOS.....	98
IV.B.1.c2.c.- Medida de la actividad de la iNOS por producción de citrulina a partir de arginina.....	100
IV.B.1.c2.d.- Efecto sobre la expresión de la iNOS.....	102
IV.B.1.c2.e.- Análisis de la actividad arginasa en el lavado. Medida de la arginina en los cultivos de macrófagos.....	104
<u>IV.B.2.- Identificación de los inhibidores de la iNOS en las muestras de lavado del injerto.....</u>	105
<u>IV.B.2.a.- Identificación de estructuras químicas.....</u>	107
IV.B.2.a1.- Estudios con HPLC.....	107

IV.B.2.a2.- Estudios con espectrometría de masas.....	111
<u>IV.B.2.b.- Titulación del efecto inhibitor de las metilargininas sobre iNOS en presencia de concentraciones prefijadas de arginina sobre los cultivos de macrófagos estimulados con LPS.....</u>	113
<u>IV.B.2.c.- Formación de MMA y ADMA en hepatocitos.....</u>	115
<u>IV.C.- RELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICOS DEL TH Y LA PRODUCCIÓN DE NITRITOS EN CULTIVOS CON LA MUESTRA</u>	
<u>A (NoA).....</u>	117
<u>IV.C.1.- Relación entre NoA y los datos del donante...</u>	117
<u>IV.C.2.- Relación entre la NoA y el tiempo de isquemia del injerto.....</u>	117
<u>IV.C.3.- Relación entre la NoA y los datos preoperatorios del paciente receptor.....</u>	118
<u>IV.C.4.- Relación entre la NoA y el SPR.....</u>	119
<u>IV.C.5.- Relación entre la NoA y las presiones pulmonares.....</u>	122
<u>IV.C.6.- Función precoz del injerto.....</u>	122

<u>IV.- DISCUSIÓN</u>	125
<u>Relación entre las alteraciones de la vía de</u>	
<u>síntesis del NO y el TH</u>	126
<i>NOS en el injerto</i>	126
<i>Medida del NO en el injerto</i>	127
<i>Efecto de las muestras sobre la actividad de la NOS</i> ..	128
<i>Efectos sobre la actividad de la iNOS</i>	129
<i>Efecto sobre la expresión de la iNOS en cultivos de</i>	
<i>macrófagos</i>	130
<i>Análisis de la actividad tipo arginasa en el lavado.</i>	
<i>Medida de la arginina en los cultivos</i>	131
<i>Efecto de las muestras sobre la actividad de</i>	
<i>la eNOS</i>	132
<i>Identificación de los inhibidores de la NOS</i>	133
<i>Limitaciones del estudio</i>	135
- <i>Relación entre los datos clínicos del TH y la producción</i>	
<i>de nitritos en cultivos con la muestra A (NoA)</i>	137
<i>Relación entre el grado de inhibición de la NOS y</i>	
<i>los datos preoperatorios del receptor</i>	140
<i>Relación entre la NoA y el SPR</i>	142
<i>Función precoz del injerto</i>	146
<u>V.- CONCLUSIONES</u>	150
<u>VI.- BIBLIOGRAFÍA</u>	153

I.- INTRODUCCIÓN

A.- EVOLUCIÓN HISTÓRICA

La historia del trasplante hepático (TH) comienza en los años cincuenta, con los primeros intentos de TH heterotópico y ortotópico en animales (Welch, 1955). El primer trasplante hepático en el ser humano lo realizó el Dr. T. E. Starzl en 1963 en Estados Unidos (Starzl y cols., 1963; 1964). Durante los siguientes años, los malos resultados obtenidos motivaron que este método terapéutico se aplicara en muy pocos casos. A lo largo de los siguientes 20 años el TH se consideró más un procedimiento en fase de investigación que una alternativa terapéutica real. A partir de la década de los ochenta, gracias a la introducción de la ciclosporina A como tratamiento inmunosupresor, el TH empezó a practicarse en un número creciente de pacientes, en más Centros y con unos resultados cada vez mejores. En 1980 la supervivencia a los seis meses del TH era del 30-45%; actualmente es de alrededor del 80% al año.

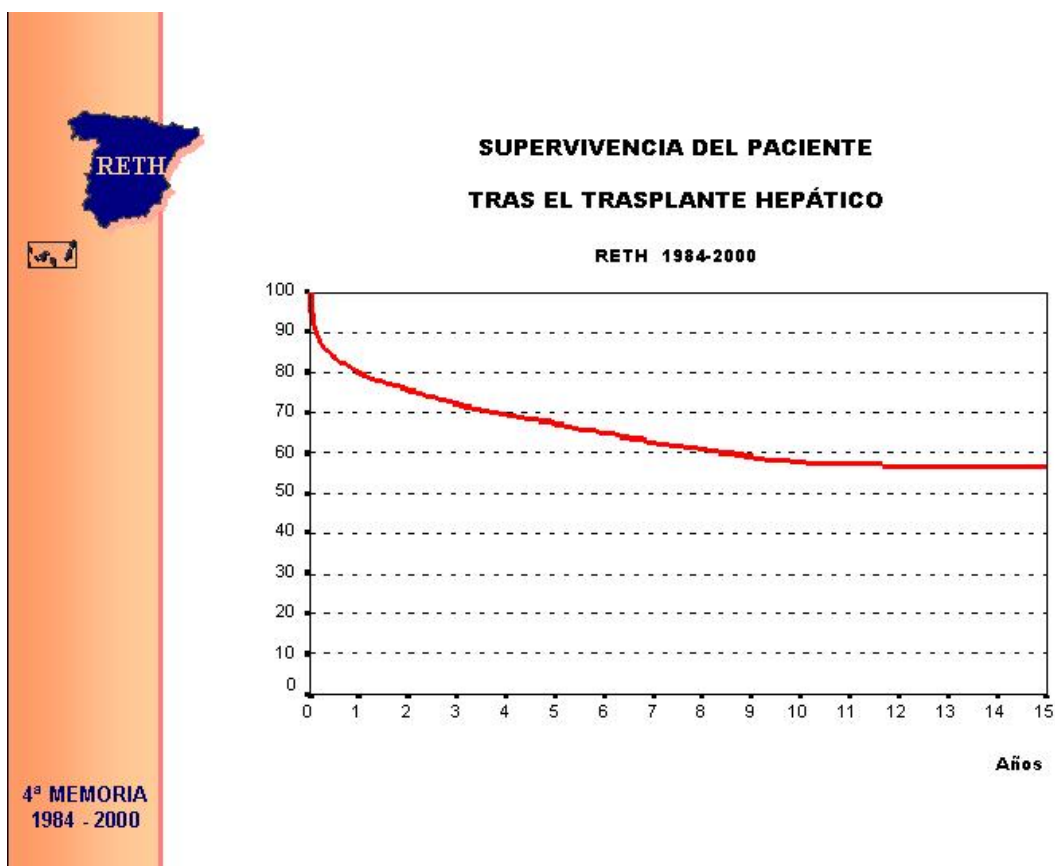


Figura 1.- Supervivencia de los pacientes tras un TH en España. Datos del Registro Español de TH.

En el Hospital General Universitario Gregorio Marañón el Programa de TH se puso en marcha en el año 1990. Desde entonces realizamos una media de 40 trasplantes al año con resultados comparables al resto de equipos trasplantadores (Calleja y cols., 1995).

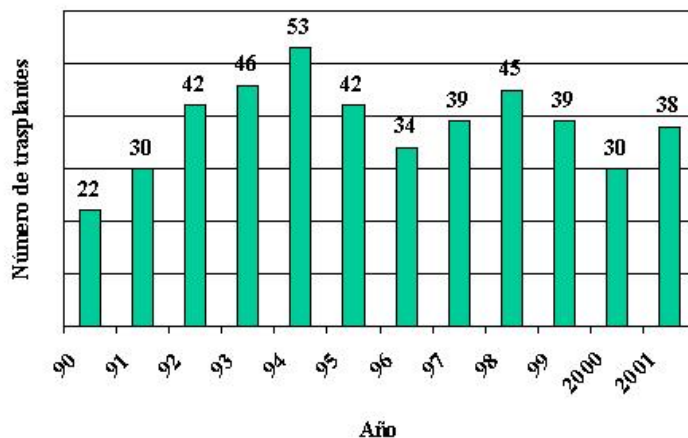


Figura 2.- Número de trasplantes hepáticos realizados en el Hospital Gregorio Marañón.

Así, a lo largo de los años, las indicaciones del TH se han ido ampliando progresivamente de forma que en la actualidad constituye un medio terapéutico bien establecido en los pacientes con enfermedades hepatobiliares progresivas e irreversibles. Sin embargo, el número de enfermos con hepatopatías potencialmente trasplantables supera con creces al número de hígados procedentes de donantes de órganos. La probabilidad de que un paciente se trasplante en España

estando en lista de espera ha pasado del 61.7% en 1998 al 54.8% en 2000; el porcentaje de mortalidad en lista de espera empeora del 6.9 al 7.6% en esos años (Datos tomados de la Organización Nacional de Trasplantes: www.msc.es/ont). Por esta razón, para conseguir una adecuada selección de los candidatos se deben tener en cuenta dos objetivos:

a) Que los enfermos incluidos se beneficien realmente del trasplante

b) Que no se incluyan pacientes en los que las expectativas de éxito sean escasas.

Por ello en la selección de pacientes candidatos a TH hay que considerar tres puntos: el tipo de enfermedad hepática susceptible de este tratamiento, el momento evolutivo de la hepatopatía y la posible existencia de contraindicaciones.

B.- INDICACIONES DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

Las hepatopatías que actualmente son objeto de TH con mayor frecuencia aparecen recogidas en la Tabla 1. No obstante hay que insistir en que el número de enfermedades que se consideran tributarias de TH aumenta constantemente de

forma que la lista abarcaría la práctica totalidad de las enfermedades con afectación hepática grave e irreversible. Ahora bien, pese al incremento constante en las donaciones, éstas resultan cada vez más insuficientes debido al aumento proporcionalmente mayor de potenciales receptores. Por ello es necesario disponer de una gestión lo más racional posible de los órganos disponibles. La Sociedad Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas y la Sociedad Americana de Trasplante han celebrado una reunión de consenso para establecer los criterios que debe cumplir un determinado paciente para ser incluido en la lista de espera de trasplante hepático en ese país (Lucey y cols., 1997). De acuerdo con estos criterios se recomienda indicar el trasplante en los pacientes en los que se prevea una probabilidad de mortalidad sin el trasplante mayor o igual al 10% en un año, independientemente de la etiología de la hepatopatía. Se podrían incluir también pacientes con mayor esperanza de vida pero que por problemas asociados a su enfermedad sufran una calidad de vida pésima (como en el caso del prurito incoercible en la cirrosis biliar primaria).

Tabla 1.- Indicaciones del TH

<p><u>A) ENFERMEDADES CRÓNICAS</u></p> <p>1.- Hepatopatía colestática</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cirrosis biliar primaria • Colangitis esclerosante primaria • Atresia de vías biliares • Enfermedad de Caroli
<p>2.- Hepatopatías de predominio hepatocelular</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cirrosis criptogénica • Cirrosis posthepatitis • Cirrosis alcohólica • Trastornos congénitos o metabólicos: • Enfermedad de Wilson • Hemocromatosis • Porfiria cutánea tarda • Déficit de α-1-antitripsina • Glucogenosis • Tirosinemia
<p>3.- Hepatopatías de etiología vascular</p> <ul style="list-style-type: none"> • Budd-Chiari
<p><u>B) TUMORES HEPÁTICOS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Hepatocarcinoma • Colangiocarcinoma
<p><u>C) INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA GRAVE</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Hepatitis vírica • Hepatitis tóxico-medicamentosa

C.- CONTRAINDICACIONES DEL TH

Tan importante como conocer las indicaciones es decidir cuándo no se debe realizar el TH. Esta necesidad es más acuciante que en otro tipo de tratamientos, porque la disponibilidad de órganos es limitada: el implante de un injerto en un paciente con pocas posibilidades de supervivencia supone privar a otra persona de esta opción en ese momento, de manera que puede fallecer mientras espera.

En el TH se producen dos situaciones fisiopatológicas de gran interés que estudiaremos detalladamente a continuación y que son las alteraciones hemodinámicas (especialmente el Síndrome de Reperusión) y la lesión ocasionada en el injerto por la isquemia y posterior reperusión (Lesión de isquemia-reperusión).

D.- ALTERACIONES HEMODINÁMICAS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

Al plantear la realización de un TH, hay que asumir que se van a producir profundas alteraciones que atañen especialmente a la situación hemodinámica, aunque también al metabolismo, la coagulación y con frecuencia a la función pulmonar y renal. Además en estos pacientes muchas funciones vitales se encuentran previamente dañadas por la insuficiencia hepática. La hepatopatía avanzada se caracteriza por un estado circulatorio hiperdinámico, con un gasto cardíaco elevado y unas resistencias sistémicas bajas (Schirier y cols., 1994). El grado de alteración de estas variables guarda relación con la intensidad de la insuficiencia hepática (Sherlock, 1990). La hipótesis más aceptada establece que la vasodilatación arterial es el fenómeno central y afecta especialmente al área esplácnica. Su causa parece ser la liberación a la circulación general de diversas sustancias vasodilatadoras (Arroyo y Gines, 1992). Además, la respuesta a los vasoconstrictores endógenos disminuye y el sistema nervioso simpático se deteriora progresivamente. Se ha empleado el término "miocardiopatía cirrótica", para designar la alteración cardíaca que puede afectar a los pacientes con cirrosis de etiología tanto alcohólica como no alcohólica. En estos casos la función ven-

tricular parece normal, pero cuando se producen situaciones de estrés no responde adecuadamente (Ma y Lee, 1996).

- D.1 REPERFUSIÓN DEL INJERTO

El escenario cardio-circulatorio, ya considerablemente perturbado antes de la intervención, se complica frecuentemente con la hemorragia, en ocasiones masiva. A esta situación se suma la reperfusión del injerto, que amenaza la estabilidad hemodinámica.

En cualquier circunstancia, la hemodinámica se rige por dos principios fisiológicos elementales: el primero es la Ley de Ohm aplicada a la hemodinámica, según la cual la presión arterial media (PAM) depende del equilibrio entre los índices cardíaco (IC) y de resistencias vasculares sistémicas (IRVS), expresada como $PAM = IC \times IRVS$. El segundo es el principio de Frank-Starling, por el que el IC, expresión de la función ventricular sistólica, depende de la precarga. La aplicación de ambos principios resulta esencial para interpretar y tratar adecuadamente los súbitos cambios hemodinámicos que surgen en el TH.

En los momentos iniciales de la revascularización del injerto sobrevienen los cambios hemodinámicos más acentuados del TH. Se distinguen por la disminución de las resistencias sistémicas y de la PAM, así como por el aumento del IC (Webster y cols., 1994). Las presiones cardíacas de llenado varían según los casos, pero suelen aumentar. Además pueden desencadenarse diversas disrritmias. Cuando el cuadro adquiere una especial magnitud se denomina síndrome de reperfusión (SPR). Se denomina SPR60 a la caída de la PAM por debajo de 60 mm Hg durante más de 1 minuto y que se produce durante los primeros 5 minutos tras la reperfusión (Millis y cols., 1997). La mayoría de los autores cifra la incidencia del SPR en torno al 30% en los pacientes adultos.

- D.1.A Génesis del SPR

El SPR se ha vinculado tradicionalmente a cinco factores: el paciente, el cardiocirculatorio, el reflejo, el quirúrgico y el metabólico.

Factor paciente

Los pacientes que precisan un TH no sólo sufren una enfermedad hepática avanzada, sino que ésta suele repercutir sobre la mayor parte de los órganos y especialmente sobre el

sistema cardiovascular. La existencia de ascitis refractaria al tratamiento se acompaña de un déficit importante de agua corporal, especialmente intracelular. Ésto repercute en la tolerancia hemodinámica a los cambios que se producen en la reperfusión del injerto (Crawford y cols., 1993).

El grado de disfunción cardiovascular en estos pacientes es muy variable. Se ha valorado esta alteración midiendo la capacidad de respuesta vasoconstrictora en respuesta a la disminución de la precarga por el clampaje de cava, y se ha demostrado que se relaciona con la incidencia de SPR (Garutti y cols., 1997).

Factor cardiocirculatorio

En un estudio de Aggarwall, los pacientes con SPR se caracterizaron por su escaso aumento del gasto cardíaco en la reperfusión. Además se ha comprobado también una disminución mayor de las resistencias sistémicas en los pacientes con SPR (Aggarwall y cols., 1989a; Zetlaoui y cols., 1989).

Estudiando la reperfusión con ecocardiograma transesofágico, se ha observado una sobredistensión del ventrículo derecho causada por exceso de volumen de llenado,

disfunción diastólica ventricular y a menudo por la embolización de aire o coágulos provenientes de los vasos hepáticos o del injerto (Ellis y cols., 1989).

Todos estos factores pueden intervenir en el comportamiento hemodinámico de los pacientes con SPR.

En general se acepta que la hipotensión del SPR es consecuencia de una vasodilatación intensa y súbita que se desencadena al pasar la sangre portal a través del injerto hacia la circulación general (Aggarwall y cols., 1987; 1993). En algunos casos el gasto aumenta lo suficiente para mantener la PAM. En el SPR, aunque también puede aumentar el IC, no lo hace lo suficiente para compensar la vasodilatación y se produce la hipotensión.

Factor reflejo

La llegada de sangre que ha bañado el injerto al corazón puede desencadenar el reflejo de Bezold-Jarisch provocando una disminución de la frecuencia cardíaca (FC) y de la PAM. Este reflejo se ha repetido experimentalmente inyectando depolarizantes químicos como el potasio directamente en la aurícula derecha (Estrin y cols., 1989; Brems y cols., 1993).

No obstante, con este reflejo la FC y la PAM disminuyen en la misma proporción, lo que no ocurre en el SPR.

Dependiendo del llenado auricular podría actuar también el reflejo de Bainbridge, que produce un aumento de la FC cuando aumenta el retorno venoso.

Factor quirúrgico

Determinadas maniobras quirúrgicas pueden cambiar la situación hemodinámica inmediatamente previa a la reperfusión y durante la misma. Se ha considerado que la derivación de sangre del territorio portal al sistémico durante la fase anhepática (es decir, durante el clampaje de porta), podría atenuar la hipotensión de la reperfusión al mantener una mejor estabilidad hemodinámica. Sin embargo cuando se empezó a hacer el TH sin derivación veno-venosa externa femoro-porto-axilar se demostró que no sólo no parece proteger (Jugan y cols., 1992), sino que en alguna serie aumenta la incidencia de SPR (Sabaté y cols., 1993).

La técnica de preservación de la cava inferior tampoco evita el SPR (Sabaté y cols., 1995). Además, cuando se asocia

a una derivación venosa externa del territorio portal, puede favorecerlo (Camprubí y cols., 1995).

Factor metabólico

La sangre proveniente del injerto en la reperfusión es típicamente fría, rica en hidrogeniones y en potasio. Estos tres factores son los que se emplean para inducir una depresión miocárdica extrema hasta la parada en la cirugía cardíaca, y podrían actuar de esta manera en el TH (De Wolf, 1991). Se han relacionado los cambios del potasio y la temperatura con la disminución de la frecuencia cardíaca, pero no con la hipotensión (Donica y cols., 1993).

Durante la disección y la fase anhepática suele ser necesario transfundir sangre y sus derivados al paciente. Como éstos se conservan anticoagulados con citrato, se puede producir una disminución del calcio iónico en el paciente, lo que ocasionaría una depresión cardiovascular (Marquez y cols., 1986). Por el mismo mecanismo puede disminuir el magnesio iónico, aunque no se ha podido relacionar la hipomagnesemia con la aparición de arritmias en la reperfusión (Díaz y cols., 1996).

El injerto hepático sufre alteraciones metabólicas en el donante (frecuentemente hipotenso) y especialmente durante el tiempo que permanece frío e isquémico y finalmente al producirse la reperfusión. Por este motivo se ha investigado la posible liberación de diversas sustancias que podrían favorecer la aparición del SPR. Entre ellas se han estudiado prostaciclina PGI_2 y tromboxano TXA_2 (Aggarwall y cols., 1989b), endotoxinas (Blanot y cols., 1995), factor de necrosis tumoral (Acosta y cols., 1994), péptido intestinal vasoactivo (McNicol y cols., 1993), factor natriurético humano (Piccini y cols., 1995) y sustancias antioxidantes (Goode y cols., 1994, El-Din y cols., 1995). Aunque muchas de ellas varían durante la reperfusión, no ha podido establecerse una relación clara con el SPR.

Un factor que podría estar implicado en la vasodilatación que caracteriza la reperfusión es el óxido nítrico (NO). En algunos trabajos se han analizado las alteraciones de la vía del NO en el TH, pero sin buscar posibles relaciones con el SPR. Sí se ha sugerido una posible implicación del déficit de arginina (ARG) (aminoácido necesario para la síntesis del NO), con el aumento de las presiones pulmonares que ocurre frecuentemente en la reperfusión (Längle y cols., 1994; 1995; Roth y cols., 1994).

En un trabajo realizado en TH en ratas se comprobó un aumento significativo de nitritos/nitratos en el lavado del injerto después de conservarlo en solución de Wisconsin, lo que sugiere un aumento de la actividad de la NOS durante la isquemia fría (Moshage y cols., 1995).

Todos estos datos nos han llevado a estudiar la posible relación entre las alteraciones de la síntesis del NO y el SPR.

E.- LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA

Una vez estudiadas las alteraciones hemodinámicas características del TH y especialmente el SPR, analizamos otra entidad fisiopatológica que es la lesión por isquemia-reperfusión.

E.1.- CONCEPTO

Se llama lesión por isquemia-reperfusión (IR) al deterioro que se produce en los tejidos al someterse a un período de isquemia, reanudándose después la perfusión. Este tipo de lesión es una fuente importante de morbilidad y mortalidad en varias enfermedades, como el infarto de miocardio, enfermedades vasculares cerebrales o periféricas y los trasplantes de órganos (Fan y cols., 1999).

En el campo del TH la lesión IR se produce por interacción de varios mecanismos y provoca grados variables de disfunción del injerto (Henderson, 1999).

Hay que tener en cuenta que, además de la lesión IR, durante el TH concurren otros factores capaces de dañar por sí mismos o de potenciar aquella lesión:

- Factores que actúan en el donante.
 - Preservación hasta el implante.
 - Variables en la técnica quirúrgica y factores que actúan en el receptor tras la reperfusión.
-
- Factores que actúan en el donante.

Antes de la extracción del hígado del donante se pueden producir situaciones de hipotensión, anemia o disminución del flujo portal por vasoconstrictores, que hacen más susceptible a la lesión IR a este órgano (Henderson, 1999). Por supuesto se rechazan los hígados muy lesionados o con enfermedad evidente, pero la desproporción entre los abundantes pacientes en lista de espera y el número restringido de donantes obliga a emplear en ocasiones los llamados "hígados subóptimos". Un ejemplo de ello es la esteatosis, en la que aumenta la susceptibilidad a la lesión IR (Hui y cols., 1995) y la incidencia de disfunción (Adam y cols., 1991).

- Preservación hasta el implante

La fase de preservación tiene una importancia capital, determinando, por lo menos en parte, el pronóstico del

paciente. Los injertos se conservan en situación de hipotermia para disminuir los procesos metabólicos y retrasar la extensión de las lesiones isquémicas. El hígado del donante se enfría "in situ" perfundiendo la solución de preservación a 4°C a través de la vena porta, de la arteria hepática, o de ambas simultáneamente. Tras la hepatectomía se mantiene el injerto sumergido en solución de preservación a 4°C hasta que se implanta en el receptor. Después de la anastomosis de la cava, el hígado se lava a través de la porta con sangre para prevenir especialmente el paso masivo de potasio (presente en grandes cantidades en la solución de preservación) a la circulación del receptor en la revascularización. Desde que se introduce el injerto en el abdomen para realizar las suturas vasculares, la temperatura excede de 4°, lo que puede aumentar la lesión, denominándose tiempo de isquemia caliente a este periodo.

- Variables en la técnica quirúrgica y factores que actúan en el receptor tras la reperfusión.

Cirugía: pueden influir factores como los defectos en las suturas que ocasionen estenosis de la porta, la cava superior o la arteria hepática, reduciendo por ello el flujo. La gravedad de la lesión IR podría tener relación con la

duración de la cirugía, con episodios de hipotensión intraoperatoria y con el grado de isquemia esplácnica.

El mantenimiento del órgano en isquemia fría produce cambios ultraestructurales que aumentan con el tiempo de almacenamiento. Entre ellos se han descrito: ampliación de las fenestraciones endoteliales, vacuolización de las células endoteliales sinusoidales y retracción de los procesos celulares (Caldwell-Kenkel y cols., 1991). En biopsias tomadas de hígados humanos durante el TH se observan signos de activación de las células endoteliales sinusoidales y de Kupffer desde el final de la preservación y se hacen más evidentes tras la reperfusión (Carles y cols., 1994). También se suele observar apoptosis en biopsias tras la revascularización (Borghesi-Scoazec y cols., 1997). La gravedad de la lesión IR también se relaciona con la duración de la cirugía, los episodios de hipotensión y el grado de isquemia esplácnica. Varios de estos factores son controlables, pero el aumento de la necesidad de hígados por incremento de los posibles receptores obliga a usar injertos subóptimos como los esteatósicos, plantear la posibilidad de los donantes a corazón parado, etc., que son más susceptibles a la lesión IR.

E.2.- FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN IR

La lesión hepática tras la reperfusión se produce por interacción de diferentes mecanismos complejos. En los momentos iniciales de la reperfusión se deteriora la microcirculación por edema de las células endoteliales (Vollmar y cols., 1994), vasoconstricción (Marzi y cols., 1994), atrapamiento de leucocitos (Jaeschke y cols., 1990; Yadav y cols., 1998), activación del complemento (Marzi y cols., 1990; Tomasdottir. y cols., 1993), activación de las células de Kupffer (Southard y cols., 1987) y de linfocitos T (Zwacka y cols., 1997; Jaeschke y Farhood, 1991), coagulopatía sinusoidal (Caldwel-Kenkel y cols., 1989, Arai y cols., 1996) y agregación de plaquetas en los sinusoides (Cywes y cols., 1993). La isquemia provoca un fallo en el transporte activo transmembrana, que a su vez desencadena el edema de las células endoteliales y de Kupffer (Vollmar y cols., 1994). La alteración de la relación entre el óxido nítrico y la endotelina (ET) produce la vasoconstricción (Scommotau y cols., 1999). Todas estas circunstancias estrechan la luz de los sinusoides disminuyendo la velocidad de circulación de los leucocitos, que se adhieren a la pared vascular entorpeciendo todavía más el flujo (Vollmar y cols.,

1996). De esta manera la hipoxia por isquemia se prolonga tras la reperfusión del injerto (Figura 3). A su vez la hipoxia activa los neutrófilos y las células de Kupffer, que producen citoquinas inflamatorias (Colletti y cols., 1996) y radicales libres (Shirasugi y cols., 1997), que agravan la lesión hepática.

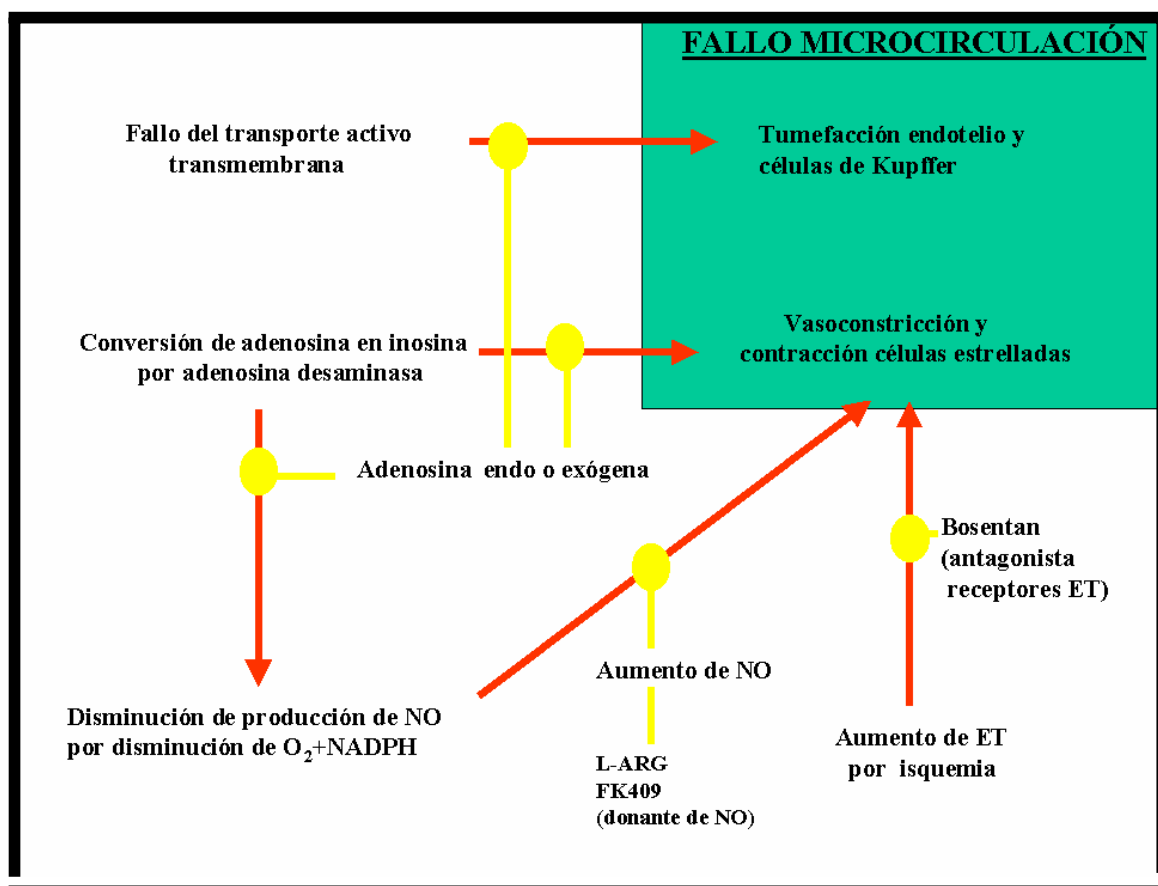


Figura 3.- Causas del deterioro de la microcirculación durante el inicio de la reperfusión (flechas) y métodos para mejorar el flujo (puntos). Tomado de Serracino-Inglott y cols., 2001.

Como veremos más adelante, la valoración de la función del injerto es un problema todavía no resuelto, especialmente en cuanto a los criterios diagnósticos. En todo caso se define la malfunción primaria (MFP) como el deterioro de la función del injerto que es incompatible con la supervivencia del receptor y que no se debe a complicaciones postoperatorias como sería la trombosis vascular o el rechazo agudo. Su frecuencia es variable (2-23%) dependiendo de los criterios diagnósticos empleados (Forster y cols., 1989a, 1989b; Shaw y cols., 1985; Greig y cols., 1989; Wall y cols., 1990). La ONT cifra actualmente en un 9,6% la incidencia de malfunción primaria en los TH realizados en España (Quinta Memoria de resultados del Registro Español de Trasplante Hepático 1984-2001). Los problemas de función del injerto pueden responder a varios factores: enfermedad hepática previa, hipotensión prolongada, administración de vasoconstrictores al donante, tiempo de isquemia prolongada y otros. En general se asume que no hay una relación directa entre los datos clínicos ni biológicos del donante y la supervivencia del injerto o del receptor (Wall y cols., 1990; Makowka y cols., 1987; Todo y cols., 1989a; 1989b). Algunos datos histológicos del hígado parecen tener mayor valor predictivo: la esteatosis masiva (de más de 2/3 de los hepatocitos) y la degeneración hidrópica de los hepatocitos

en las biopsias extraídas antes de la hepatectomía en el donante, se asocian estrechamente con MFP (Todo y cols., 1989a; D'Allesandro y cols., 1991).

El diagnóstico de MFP se hace habitualmente tras 24-48 h. de fallo hepatocelular grave con deterioro de la conciencia, sangrado por coagulopatía y escasa producción de bilis. Las pruebas de laboratorio en ese momento incluyen cifras altas de transaminasas en sangre, hipoglucemia, coagulopatía grave, hipercaliemia, acidosis metabólica y fallo renal (Greig y cols., 1989; Moncorgé y cols., 1989). En el estudio histológico se encuentran lesiones necróticas inducidas por coagulación, especialmente en la zona centrolobulillar, aunque se pueden extender al hígado entero en casos graves (Snover y cols., 1984; Demetris y cols., 1985). Uno de los problemas de la MFP es que los criterios diagnósticos no se han estandarizado. Se han propuesto dos tipos de criterios: muerte del receptor o necesidad de retrasplante urgente (que depende del protocolo de cada Centro) (Todo y cols., 1989a), o criterios clínicos y biológicos (Markowka y cols., 1987). El grupo de Toronto (Greig y cols., 1989) clasifica la función precoz del injerto en cuatro categorías dependiendo de las cifras de alanina aminotransferasas (AST), producción de bilis y datos de

coagulación en las primeras 72 h postrasplante (Tabla 2). Las alteraciones del grado de conciencia no se tienen en cuenta porque en los casos de mala función frecuentemente se precisa ventilación mecánica y la analgesia y sedación que se administran interfieren en este dato. Este grupo considera MFP a los casos con función III o IV, aunque esta definición sobrestima su incidencia porque algunos injertos de función III se recuperan y sobreviven los receptores.

Tabla 2.- Clasificación de la función precoz del injerto según el grupo de Toronto (Greig y cols., 1989)

	FUNCIÓN I	FUNCIÓN II	FUNCIÓN III	FUNCIÓN IV
AST en sangre U/l	<1000	>1000	>2500	>2500
Producción bilis ml/día	>40	>40	<40	0
Coagulopatía	Leve y mejora	Leve y mejora	Moderada	Grave

La tasa de mortalidad debida a la MFP es del 70 al 80% (Forster y cols., 1989a; Greig y cols., 1989). Los mejores criterios predictivos de este desenlace son: bilirrubina y transaminasas (especialmente AST) muy altas y mantenidas,

Factor V disminuido y baja producción de bilis (Forster y cols., 1989a; 1989b).

Se han estudiado otros test para la detección precoz de la MFP, como la capacidad de eliminación de galactosa y cafeína o el aclaramiento de aminoácidos y lactato, pero los resultados son discutibles (Nagel y cols., 1990; Svensson y cols., 1989).

E.2.A.- FACTORES ENDÓGENOS IMPLICADOS EN LA LESIÓN IR

Entre los factores que pueden influir en la lesión IR se han estudiado los siguientes: citoquinas (especialmente el factor de necrosis tumoral- α y la interleukina-1), células de Kupffer, neutrófilos, sustancias antioxidantes, factor nuclear κ B, adenosina, endotelina y óxido nítrico. En este trabajo nos interesa especialmente éste último.

E.2.A.1.- Óxido nítrico

Durante la investigación del mecanismo de acción de la acetil-colina (ACh) sobre las células endoteliales, Furchgott postuló que la ACh debía su efecto vasodilatador a la acción sobre los receptores muscarínicos de las células del

endotelio, estimulando la liberación de una o varias sustancias que actuarían sobre las células del músculo liso vascular, activando los mecanismos de relajación. Esta sustancia o conjunto de sustancias vasodilatadoras no identificadas y producidas en el endotelio se denominaron Factor Relajante Derivado del Endotelio (EDRF) (Furchgott, 1981). Cuando se despojaban del endotelio las preparaciones vasculares, desaparecía la acción relajante de la ACh e incluso ésta llegaba a producir una contracción.

La caracterización del EDRF como óxido nítrico fue un proceso lento que se inició con la descripción de las características de esta sustancia. Se comprobó que el EDRF tenía una vida media biológica muy corta (cinco a seis segundos) en soluciones salinas fisiológicas oxigenadas (Rubanyi y cols., 1985; Gryglewski y cols., 1986a). Su acción se inhibía con sustancias que generasen radicales O_2^- , (Moncada, 1986). También se inhibía su acción con la hemoglobina (que contiene Fe^{2+}) y con las condiciones de hiperoxia (Gryglewski y cols., 1986b; Rubanyi y cols., 1986). El efecto del EDRF sobre el músculo liso se debe a la estimulación de un enzima citosólico, la guanilato ciclasa soluble. La activación de este enzima produce un incremento de la concentración de guanosín-3'-5'-monofosfato cíclico

(GMPc) en el interior de la célula, fosforilación de proteínas por la proteína quinasa GMPc-dependiente e inhibición del aparato contráctil. El efecto relajante del EDRF desaparecía en presencia de azul de metileno, al ser éste un inhibidor de la guanilato ciclasa (Martin y cols., 1985).

El EDRF se caracterizó finalmente como NO. Los primeros que sugirieron que el EDRF podría ser NO fueron los grupos de Furchgott e Ignarro. Ambos hicieron esta sugerencia de forma independiente con dos comunicaciones presentadas simultáneamente en el XXX Congreso Internacional de Ciencias Fisiológicas en 1986 (Ignarro y cols., 1988; Furchgott, 1988).

Desde su descripción se ha prestado una gran atención a este gas formado por una molécula pequeña y difusible, descubriendo que juega un importante papel en varios procesos fisiológicos en casi todos los tejidos. Además su área de influencia es marcadamente amplia, incluyendo la regulación del tono vascular, neurotransmisión, mecanismos de defensa antimicrobianos y modulación de la reacción inmunitaria (Hon y cols., 2002).

BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO

El enzima encargado de la síntesis de NO se denomina NO sintasa (NOS) (Moncada y cols., 1991; Nathan, 1992). La NOS cataliza la oxidación de L-arginina a L-citrulina liberando NO. La NOS es una hemoproteína que además del sustrato requiere oxígeno (Leone y cols., 1991), calmodulina y otros cofactores: dinucleótido de nicotinamida, adenina monofosfato, NADPH (Palmer y Moncada, 1989; Knowles y cols., 1994), flavín adenina dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH₄).

Se han descrito en los mamíferos tres isoformas de la NOS codificadas por diferentes genes (Knowles y cols., 1994; Griffith y Stuehr, 1995). La nomenclatura inicial de la NOS reflejó la observación inicial de que la síntesis no se producía en células inflamatorias no activadas, pero que podía inducirse por inmunoactivación, lo que llevó a llamar a esta isoforma NOS inducible (iNOS). En contraste se describió una NOS presente en situación normal en algunas células, por lo que se le aplicó el nombre de NOS constitutiva (cNOS) (neuronal nNOS, endotelial eNOS). Actualmente se sabe que algunas situaciones (estrés hemodinámico, lesión neuronal) pueden inducir la expresión

genética de la eNOS y la nNOS. También la iNOS puede funcionar como una enzima constitutiva en condiciones fisiológicas en algunas células (Guo y cols., 1995). Por ello se aconseja emplear una nomenclatura que identifique más claramente la isoforma por el tejido de origen de la proteína y el cADN (Michel y Feron, 1997).

La nNOS se purificó inicialmente a partir de tejido nervioso. Hoy sabemos que se encuentra en otros tejidos y especialmente en músculo esquelético.

La iNOS se purificó originalmente de macrófagos inmunoactivados, pero posteriormente se ha descrito en multitud de células: miocitos tanto cardíacos como vasculares, células de la glía, etc.

La eNOS fue la última isoforma que se aisló en mamíferos. Se purificó inicialmente a partir de endotelio vascular, pero también se encuentra en miocitos cardíacos, plaquetas, células del hipocampo, etc.

Los genes para las isoformas de la NOS se denominan en el orden en que se fueron aislando y caracterizando, de

manera que los genes humanos que codifican la nNOS, la iNOS y la eNOS se llaman NOS1, NOS2 y NOS3 respectivamente.

Hay que tener en cuenta que la misma isoforma puede jugar un papel biológico enteramente distinto dependiendo de en qué tejido se exprese. Por ejemplo, el mRNA de la nNOS genera proteínas estructuralmente diferentes cuando el enzima se expresa en neuronas, de las que produce cuando se expresa en músculo esquelético (Silvagno y cols., 1996). Otro ejemplo de la regulación específica en cada tejido es que la eNOS se asocia a diferentes isoformas de la caveolina dependiendo de que se encuentre en células endoteliales o en miocitos cardíacos.

A pesar de las diferencias citadas, las distintas isoformas de la NOS tienen importantes similitudes bioquímicas. La secuencia de aminoácidos que compone las tres isoformas en humanos es idéntica en un 55%, con una mayor coincidencia en la secuencia especialmente en las regiones de la proteína relacionadas con la catálisis (Michel y cols., 1995). El esquema de catálisis en las tres NOS es similar, con una oxidación de los cinco electrones del terminal nitrógeno-guanidina del aminoácido L-arginina para formar NO y L-citrulina, en una reacción compleja que

incluye oxígeno molecular y NADPH como cosustratos y otros cofactores redox como el grupo hemo, tioles reducidos, FAD, FMN y BH₄. La síntesis de NO por las tres isoformas depende de la unión del enzima a la calmodulina, proteína ubicua que regula el calcio. La eNOS y la nNOS necesitan un incremento de la concentración de calcio intracelular para unirse a la calmodulina y así activarse totalmente. En cambio la iNOS posee una afinidad extremadamente alta por la calmodulina incluso con las concentraciones bajas de calcio típicas de las células en reposo. Por este motivo la actividad intracelular de la eNOS y la nNOS se modula estrechamente por cambios temporales de la concentración de calcio iónico, mientras que la actividad de la iNOS en células inmunoactivadas no se regula de esta forma (Nathan y cols., 1994).

Se ha descrito que también se puede formar NO independientemente de la NOS por reducción de nitritos en condiciones de acidosis y en un ambiente reductor (Zweier y cols., 1999).

- Localización de la NOS

El NO lleva a cabo diferentes tareas en las células en las que se sintetiza y además interactúa con las células vecinas. En estas interacciones el NO puede estabilizarse o degradarse, lo que sugiere que la localización de la NOS debe repercutir sobre el papel del NO sintetizado. Casi todas las estructuras intracelulares se han postulado como localización de la NOS, desde el núcleo a la membrana. No hay evidencias de que ninguna de las isoformas de NOS se localice en el núcleo, aunque si hay datos sugerentes en estudios inmunohistoquímicos, documentando efectos del NO sobre la transcripción génica (Buchwalow y cols., 1997). La mayor parte de la nNOS en neuronas se asocia al retículo endoplásmico rugoso (Xia y cols., 1996). La NOS en las mitocondrias parece tener un papel regulador de la fosforilación oxidativa (Michel y cols., 1997). Está claro que la nNOS del músculo esquelético se asocia al sarcolema a través del citoesqueleto (Michel y cols., 1997). También se ha descrito NOS (especialmente la isoforma endotelial) en la membrana plasmática y en las caveolas, principalmente en las células endoteliales y los miocitos cardíacos (Parton y cols., 1994; Couet y cols., 1997).

- Regulación transcripcional

Un factor común entre varios mediadores de la lesión IR hepática es su regulación transcripcional. En este sentido la factor nuclear κB (NF- κB) es importante al regular la transcripción de la forma inducible de la NOS (Hur y cols., 1999), de las citoquinas (Ej. TNF α), quimioquinas (Ej. proteína epitelial 78 activadora de los neutrófilos) y de moléculas de adhesión (Ej. Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)) (Ghosh y cols., 1998).

El NF- κB transmite señales a la maquinaria de transcripción del núcleo al unirse a regiones reguladoras κB del ADN. Esta acción se regula estrechamente por medio de proteínas inhibidoras I- κB . Cuando se produce un estrés oxidativo las I- κB se defosforilan y se degradan, permitiendo la traslocación del NF- κB al núcleo (Ghosh y cols., 1998). Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno, que es una importante fuente de radicales libres y que se produce abundantemente durante la IR hepática (McCord, 1985), activa el NF- κB (Li y cols., 1997).

Algunos experimentos con modelos de IR hepática en rata y ratón han demostrado que la unión del NF- κ B aumenta marcadamente 30 a 60 min. tras la reperfusión y disminuye 4 a 5 horas después ((Hur y cols., 1999; Yoshidome y cols., 1999; Bell y cols., 1997). Ésto produce un aumento en la expresión del mRNA para la iNOs (Hur y cols., 1999), el TNF α (Yoshidome y cols., 1999) y el ICAM-1 (Yoshidome y cols., 1999; Bell y cols., 1997). En un modelo de rata se consiguió la inhibición de la unión del NF- κ B con el antioxidante N-acetilcisteína, lo que sugiere que la activación del NF- κ B durante la IR hepática puede estar mediada por los radicales libres de oxígeno (Hur y cols., 1999).

FUNCIÓN DEL NO

El NO actúa habitualmente activando la guanilato ciclasa soluble al unirse al hierro del grupo hemo, lo que aumenta la concentración de GMPc (Schmidt y cols., 1993). También puede unirse al hierro de grupos no hemo, especialmente al grupo sulfuro-hierro de varios enzimas, alterando su actividad. Entre dichos enzimas se encuentran los del ciclo respiratorio, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y de la síntesis del ADN (Nathan, 1992). Indirectamente el NO se

combina con los aniones superóxido formando peroxinitrito, que es altamente reactivo y se relaciona con la peroxidación de los lípidos y la nitrosilación de los residuos tirosina en las proteínas.

El NO cumple varias funciones, entre las que están la regulación local del flujo de sangre como EDRF (Palmer y cols., 1987), inhibición de la agregación plaquetaria (Furlong y cols., 1987) y atenuación de la adhesión de neutrófilos (Lefer y cols., 1991; Kurose y cols., 1994). Por otra parte el NO puede aceptar electrones, ya que posee un electrón no apareado, por lo que funciona como un atrapador natural de aniones superóxido (Gryglewski y cols., 1986b; Rubanyi y cols., 1986). Esta función se considera protectora en la IR, pero el NO también posee un efecto citotóxico por inhibir la respiración mitocondrial (Stuehr y cols., 1989; Hibbs y cols., 1988). Por otra parte, el NO se convierte en peroxinitrito al reaccionar con superóxido y el peroxinitrito inicia la peroxidación de los lípidos y causa nitrosilación de las proteínas (Beckman y cols., 1990; Haddad y cols., 1994). Está claro que el NO puede comportarse como protector y como tóxico dependiendo de las circunstancias que se analicen (Wang y cols., 2002; Hon y cols., 2002).

ANTAGONISTAS DEL SISTEMA DEL NO

Los inhibidores de la NOS se han estudiado extensamente. Entre los inhibidores naturales conocidos en mamíferos y entre ellos en humanos, se encuentran la NG-monometil-L-arginina (MMA) y la NG,NG-dimetil-L-arginina en su forma asimétrica (ADMA) (Leiper y Vallance, 1999). También se produce naturalmente la forma simétrica de la dimetil-arginina (SDMA), pero ésta no inhibe la NOS. La estructura de estos compuestos se observa en la Figura 4. Las proteína-arginina N-metiltransferasas catalizan la metilación del nitrógeno guanidínico de la arginina para producir estos derivados, que se liberan al citoplasma por proteólisis (Vallance, 2001). Especialmente la ADMA se ha detectado en plasma de animales y de pacientes con hipercolesterolemia, insuficiencia renal, aterosclerosis, hipertensión y en otras entidades.

Los inhibidores de la NOS, incluso en bajas concentraciones, pueden producir efectos sustanciales en el aparato cardiovascular, especialmente cuando se mantienen en el tiempo. En parte ésto puede suceder porque las metilargininas entran en las células endoteliales por

transporte activo y pueden alcanzar concentraciones intracelulares altas (Bogle y cols., 1995).

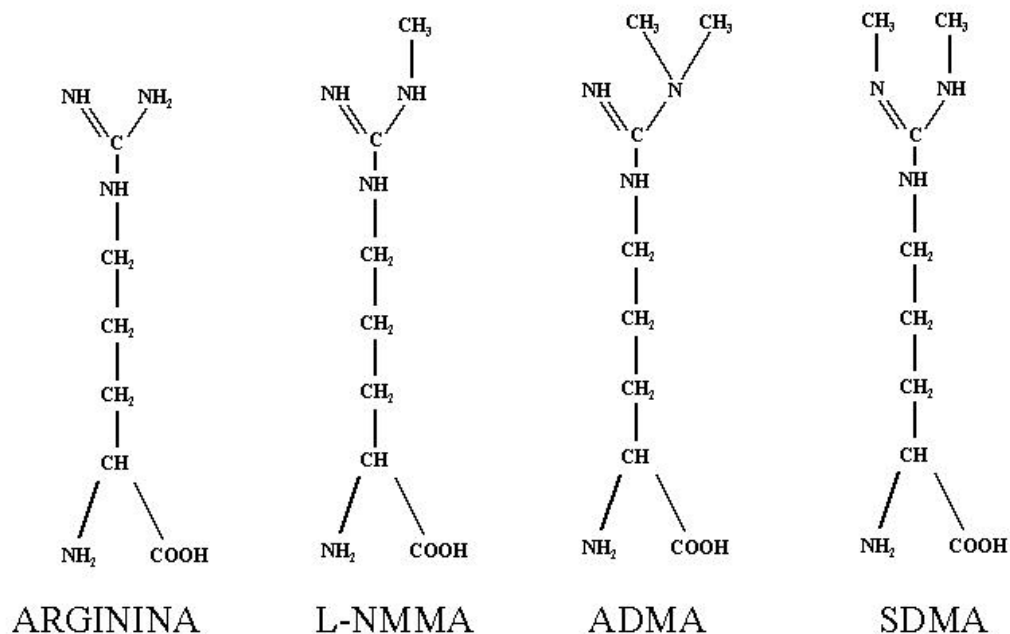


Figura 4.- Estructura de la L-arginina y sus derivados endógenos metilados. NG-monometil-L-arginina (LNMMA), NG-NG-dimetil-arginina asimétrica (ADMA) y simétrica (SDMA).

En vasos humanos, la MMA 1 μ M causa más de un 20% de inhibición de la vasodilatación inducida por bradiquinina (MacAllister y cols., 1994). En pacientes en shock séptico la infusión de MMA para conseguir una concentración plasmática

de 5 μM produce un aumento de las resistencias periféricas superior al 70% y aumenta la PAM un 10-15% (Petros y cols., 1994). La ADMA también produce efectos biológicos a bajas concentraciones: 10 μM aumentan un 15% la PAM en cobayos (Vallance y cols., 1992).

Estos efectos también se han estudiado en pacientes cirróticos con ascitis descompensada, comprobando que se produce un aumento de la PAM con inhibidores de la NOS. Con dosis de 3 mg/Kg de MMA aumenta la tensión por aumento de las resistencias, aunque disminuye el gasto cardíaco y el flujo sanguíneo hepático (Saphr y cols., 2002).

E.2.B.- NO Y LESIÓN IR

En el hígado se encuentra la NOS en los hepatocitos, las células de Kupffer y las células endoteliales. Hay dos isoformas mayoritarias de la NOS en el hígado: la eNOS y la iNOS. La nNOS también se ha descrito en el hígado, pero restringida a las terminaciones nerviosas encontradas en grandes vasos (Hon y cols., 2002). La eNOS se expresa como constitutiva y su actividad depende del Ca^{++} y de la calmodulina (Vasquez-Vivar y cols., 1998). En cambio, la iNOS se expresa en macrófagos (incluidas células de Kupffer),

hepatocitos y neutrófilos en el hígado y responde a estímulos extracelulares como las citoquinas y al lipopolisacárido dando lugar a niveles de NO mucho mayores que los producidos por la vía de la eNOS

La lesión IR es un cuadro importante que se produce en el TH, pudiendo ocasionar una malfunción primaria que obligue a un retrasplante urgente. La fisiopatología de este síndrome se basa en la generación de derivados reactivos del oxígeno, en la liberación de citoquinas inflamatorias y en las alteraciones de la microcirculación. Como el NO influye en estas situaciones se ha generado una gran cantidad de trabajos de investigación sobre su relación con la lesión IR.

En general, en la experimentación animal, la potenciación de la vía del NO mejora la viabilidad de los injertos hepáticos (Inglott y Mathie, 2000):

1.- La administración de L-ARG antes de la IR disminuye las lesiones observadas en las biopsias, la liberación de transaminasas (índice de citolisis) (Higa y cols., 2000; Uhlmann y cols., 1998; 2000; Koepfel y cols., 1997; Jones y cols., 1996; Calabrese y cols., 1997; Galen y cols., 1999; Shimamura y cols., 1999; Cottart y cols., 1999; Nilsson y

cols., 2001; Yagnik y cols., 2002) y en algunos estudios mejora la supervivencia de los animales de experimentación (Calabrese y cols., 1997; Shimamura y cols., 1999).

2.- La administración de donadores de NO, como el FK409 (Ohmori y cols., 1998), el nitroprusiato (Nilsson y cols., 2001) y la spermina NONOate (Peralta y cols., 2001) antes de la reperfusión del injerto también mejoran la microcirculación en la reperfusión y reducen la citolisis. El V-PYRRO/NO (O_2 -vinil 1-[pirrolidin-1-yl]diazén-1-ium-1,2-diolato) que libera selectivamente NO en los hepatocitos al ser metabolizado por el citocromo P450, también mejora la función hepática tras el TH en cerdos (Ricciardi y cols., 2001).

3.- Por otra parte la administración exógena de inhibidores de la NOS, en general, deteriora la viabilidad de los injertos:

a) Con L-NNA (N^{ω} -nitro-L-arginina) aumenta la lesión endotelial, disminuye el flujo hepático en la reperfusión (Kobayashi y cols., 1995) y aumenta la citolisis (Cottart y cols., 1999). Sólo en el trabajo de Nilsson y cols. (2001) no cambia la lesión al añadir este inhibidor.

b) Con L-NAME (L-arginina nitro metiléster, inhibidor preferente de la eNOS, pero también de la iNOS), los resultados son contradictorios: en algunos estudios empeora la perfusión (Koeppel y cols., 1997; Peralta y cols., 2001), aumenta la citolisis (Koken y cols., 1999; Peralta y cols., 2001) y aumentan los datos de lesión de IR (Liu y cols., 2000; Yagnik y cols., 2002). Sin embargo, en el trabajo de Higa y cols. (2000) la infusión de L-NAME no cambia ningún dato de lesión. Incluso en el trabajo de Ozakyol y cols. (2000) (rata, isquemia hepática caliente de 30 min., L NAME 50 mg/Kg), básicamente igual al de Liu y cols. (2000) (rata, isquemia hepática caliente de 30 min., L NAME 10 mg/Kg) el LNAME claramente disminuye la lesión.

c) Con MMA se comprueba un aumento de la mortalidad del animal (Isobe y cols., 1999).

d) Con aminoguanidina (inhibidor preferente de la iNOS), no cambia la lesión IR (Cottart y cols., 1999), o se consigue una disminución de la lesión (Isobe y cols., 1999). Con L-N⁶-(1-imino-etil)lisina (L-NIL), aumenta ligeramente la concentración de transaminasas y la apoptosis en el injerto (Yagnik y cols., 2002)

De todos estos datos deducimos que en los modelos animales las variables relacionadas con la especie animal, el tiempo de isquemia, que ésta sea caliente o fría, el tipo de inhibidor administrado, al igual que la dosis y posiblemente, el momento de su administración, hacen que los resultados cambien notablemente, llegando incluso a parecer contradictorios.

En la Tabla 3 se resume la bibliografía publicada sobre la influencia de la NOS y sus variaciones sobre la lesión IR.

Tabla 3.- Bibliografía sobre lesión IR y NOS.

ANIMAL	MODELO DE ISQUEMIA Y TIEMPO	L-ARG	OTROS		CITA
Rata	Caliente 60'	Protege de daño por LNNA	LNNA aumenta lesión endotelial y disminuye flujo		Kobayashi 1995
Rata	Bajo flujo-reperf sin sangre	Protege de IR	LNAME evita la protección por ARG		Jones 1996
Rata	Caliente 70'	Mejor perfusión menos leucocitos	LNAME peor perfusión		Koepfel 1997
Cerdos	Caliente 120'	Menor lesión bioquim. e histol. Más supervivencia			Calabrese 1997
Rata	Caliente 30'		LNAME aumento citolisis		Koken 1999
Perro	Caliente 2h	Mejora bioquim. e histol. Aumenta supervivencia	FK409 mejora como ARG, pero con hipotensión		Shimamura 1999
Rata	Caliente 45'	Menor lesión	LNNA aumenta citolisis	Aminoguanidina sin cambios IR	Cottart 1999
Cerdo	Caliente 2h		Nitro-LARG aumenta mortalidad	Aminoguanidina disminuye lesión	Isobe 1999
Rata	Caliente 30'		LNAME aumenta la lesión IR		Liu 2000
Rata	Fría 60'	Ligera disminución lesión	LNAME no cambia lesión		Higa 2000
Rata	Caliente 30'	Mejora flujo y disminuye citolisis			Uhlmann 2000
Rata	Caliente 30'		LNAME clara disminución lesión IR		Ozakyol 2000
Rata	Células sinusoidales aisladas en frío	NO protege de lesión por isquemia fría			Oishi 2001
Rata	Isquemia fría 18 h	Mejora lesión IR	L-NAME aumenta necrosis	L-NIL aumenta transaminasas y apoptosis	Yagnik , 2002

NO Y LESIÓN IR EN HUMANOS

En humanos el proceso de IR es diferente de los modelos animales porque, aparte de posibles diferencias de especie, el hígado se conserva en isquemia fría una media de 8 horas en solución de Wisconsin. Esta situación podría inducir la iNOS como ocurre en la isquemia hepática caliente transitoria (Sugawara y cols., 1998), aunque en otros trabajos no se demuestra una expresión de la iNOS por la isquemia (Smith y cols., 1997).

Längle y cols. (1994, 1995) estudiaron la vía de la síntesis del NO en 10 TH en humanos, demostrando una gran disminución de la ARG plasmática desde 10 seg. tras la reperfusión, disminución que se mantenía más de 24 h. Analizaron también la arginasa, que aumentó de 18 ± 13 IU/L a 2384 ± 1456 IU/L inmediatamente tras la reperfusión. Simultáneamente la medida de nitritos (NO_2^-) disminuyó al 50%. En cambio la concentración de nitratos (NO_3^-) no cambió. Es decir que se libera gran cantidad de arginasa del injerto, lo que causa una disminución de la ARG. Además disminuyen los nitritos, lo que podría significar una disminución de la producción de NO tras la reperfusión en humanos (Längle y cols., 1994; 1995; Roth y cols., 1994).

Sin embargo Esteban y cols. (1995) mostraron que la producción de NO_2^- y NO_3^- durante el TH humano aumenta alcanzando el máximo 60 min. tras la reperfusión, pero sólo en los casos con lesión hepática por la isquemia. En los casos sin lesión por isquemia nitritos y nitratos permanecieron estables durante el TH e incluso disminuyeron a partir de las tres horas de la reperfusión. Además constataron una correlación significativa (aunque con un factor de correlación bajo $r=0.45$) entre la concentración de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ y el gasto cardíaco. También demostraron una correlación entre la concentración de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ y las mínimas resistencias sistémicas tras la reperfusión ($r=0.69$) en los casos con lesión isquémica. Es decir, que parece haber una relación entre el aumento de los metabolitos del NO y la presencia de una lesión isquémica del injerto. En los casos sin lesión no varía la concentración de metabolitos del NO durante las primeras tres horas de la reperfusión y después de ellas disminuye.

Ioannidis y cols. (1995) también midieron nitratos en plasma de 32 pacientes tras un TH, encontrando que la concentración de nitrato aumentó unos días tras el

trasplante, pero sólo en los pacientes que desarrollaron infección o rechazo.

En un trabajo realizado en 15 pacientes midiendo concentración de transaminasas y derivados del NO en plasma durante el TH, los datos clínicos evolucionaron normalmente, aumentando las transaminasas tras la reperfusión y normalizándose en unos días. En cambio el NO aumentó y permaneció así incluso 15 días después (Zanaro y cols., 2001).

Más recientemente se han estudiado 13 TH en humanos midiendo nitritos y nitratos en plasma, sin encontrar variaciones durante el trasplante (Battista y cols., 2002).

En resumen, en el TH humano, la escasa bibliografía existente indica:

- No parece producirse una inducción de la iNOS durante la isquemia.
- Se libera gran cantidad de arginasa del injerto.
- La medida de los metabolitos del NO tras la reperfusión es muy variable dependiendo de las

series, el método de determinación y posiblemente del grado de lesión del injerto durante la isquemia.

- La medida de los metabolitos del NO tras la reperfusión parece relacionarse con la situación hemodinámica tras la reperfusión en los casos con lesión del injerto.

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Las variaciones de la síntesis del NO pueden jugar un importante papel en el TH humano, pero los datos hasta ahora son discrepantes e incompletos.

En primer lugar la vasodilatación brusca que se describe inmediatamente tras la reperfusión podría estar relacionada con un aumento de la síntesis del NO.

En segundo lugar, pero más importante por su mayor repercusión clínica, la lesión de isquemia reperfusión en la experimentación animal parece reducirse al potenciar la producción del NO, llegando incluso a aumentar la supervivencia de los ejemplares estudiados. La escasa literatura sobre humanos apunta a una posible coincidencia entre la lesión del injerto y el aumento de la síntesis de NO.

OBJETIVOS

II.- OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo fue el estudio del papel del Sistema del NO en el trasplante hepático, para lo que nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Estudiar si en el injerto hepático se produce la inducción de la iNOS durante la IR mediante el análisis directo en en las biopsias hepáticas y la medida de los productos de degradación (nitritos y nitratos) en el lavado del injerto durante la reperfusión.

2.- Analizar si el lavado del injerto tras la IR es capaz de alterar la vía de la síntesis del NO mediante dos bioensayos: en cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratón (para estudiar la iNOS) y en anillos de aorta de conejo (para analizar la eNOS).

3.- En el caso de demostrar alteraciones de la vía de la síntesis del NO, identificar los factores implicados y los mecanismos moleculares que se ven afectados.

4.- Analizar posibles relaciones entre las alteraciones de la síntesis del NO y la hipotensión en el receptor (Síndrome de reperfusión).

5.- Analizar la relación entre las alteraciones de la síntesis del NO y el grado de función del injerto.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

III.- PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

III.A.- PACIENTES

III.A.1.- Criterios de inclusión y exclusión

Realizamos un estudio longitudinal, prospectivo observacional en un total de 77 pacientes sometidos a Trasplante Hepático en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, desde el año 1997 a la actualidad (Tabla 4).

El estudio se dividió en dos fases. En la primera analizamos las muestras y datos de los primeros 20 pacientes que dieron su consentimiento para el estudio, obtenidos consecutivamente durante el año 1997. Posteriormente se estudiaron otros 57 pacientes sometidos a TH seleccionando aquellos con peor función del injerto.

Tabla 4.- Resumen de las características de los pacientes estudiados (media \pm desviación estándar (DS) o n(%)).

CARACTERÍSTICAS	n (%)	MEDIA \pm DS
Edad (años)		50 \pm 11
Sexo		
Hombre	62 (80.5)	
Mujer	15 (19.5)	
Diagnóstico		
Carcinoma Hepatocelular + cirrosis	2 (2.6)	
Cirrosis alcohólica	29 (37.7)	
Cirrosis post-hepatitis	26 (33.7)	
Cirrosis biliar primaria	6 (7.8)	
Colangitis esclerosante	1 (1.3)	
Malfunción primaria del injerto	1 (1.3)	
Hepatitis aguda fulminante	7 (9.1)	
Trombosis arterial	3 (3.9)	
Rechazo crónico del injerto	2 (2.6)	
{ Re-trasplante	Trasplante	71 (92.2)
	Re-trasplante	6 (7.8)
Clase Child-Pugh (Pacientes cirróticos)		
A	3 (5.2)	
B	27 (47.3)	
C	27 (47.3)	
Tiempo de isquemia (min.)		515 \pm 171

Fueron criterios de exclusión: 1) Hipertensión pulmonar (presión pulmonar media mayor de 25 mm Hg con presión de enclavamiento pulmonar menor de 16 mm Hg), porque la situación hemodinámica requiere la administración de fármacos específicos, incluido NO inhalado, que podrían artefactar los resultados analíticos. 2) El sangrado vascular intenso en la reperfusión (transfusión de más de 2 concentrados de hematíes en los primeros 5 minutos), que impide el diagnóstico correcto de SPR. 3) La necesidad de administrar inotropos o vasoconstrictores antes de la reperfusión del injerto. También se excluyeron del estudio los casos en los que se emplearon injertos considerados subóptimos por presentar datos de esteatosis.

III.B.- ANIMALES

Se trabajó con conejos blancos adultos Nueva Zelanda, ratas macho Albino Wistar de tres meses y ratones macho adultos.

Se cumplieron el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo (BOE del 18) y la Orden del 13 de Octubre de 1989 (BOE del 18) sobre protección de los animales utilizados para experimentación. La manipulación de animales se realizó cumpliendo la *Guía para el cuidado y uso de animales de*

laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH Publication N° 85-23, revisada en 1985).

III.C.- MATERIAL

III.C.1.- Aparatos

- Quirófano

Respirador Dräger modelo Cicero.

Monitor Kontron modelo Kolormon 7250 con registradora continua.

Monitor para la determinación del gasto cardíaco y de la saturación en sangre venosa mixta: Continuous cardiac output/SO2 computer de Abbott.

Bombas volumétricas de infusión IVAC modelo 598.

- Laboratorio

Balanza de precisión y granatarios de Sartorius, modelos 1203 MP y 1207 MP-2 y pHmetros de Radiometer Copenhagen, modelo 52.

Campana de flujo laminar Telstar modelo PV-100.

Microscopio de platina invertida Nikkon/TMS.

Incubador de células Heraeus.

Cánula de plástico (Braunula 1-G16) de Braun Melsungen AG, Alemania.

Centrifugadora Heraeus modelo Minifuge T.

Contador de centelleo líquido Rackbeta LKB.

Densitómetro Molecular Dynamics (Kemsing, USA).

Espectrofotómetro Hitachi modelo U-2000.

Cubetas y fuentes de electroforesis (Power pac 300 y 3000) para el fraccionamiento de proteínas y ARN fueron de Bio-Rad (Richmond C.A., USA).

El material se esterilizó en un autoclave Autoester-G.

Revelador de películas Curix 60 de Agfa.

Membranas Nytran (NY-13N) de Schleicher y Schuell (Darmstadt, Alemania).

Las placas de cultivos eran Falcon (Lincoln Park, NJ)

Los medios de cultivo fueron de BioWhittaker (Walkersville, MD).

Homogeneizador con pistilo de teflón modelo K 43 de Tri-Instruments (Rockville, NY., USA).

Cubetas y fuentes de electroforesis (Power pac 300 y 3000) de Bio-Rad (Richmond C.A., USA).

Aparato de transferencia de proteínas de Bio-Rad con sistema Vacune-Gene[™] de Pharmacia (Upsala, Suecia).

Centrífuga eppendorf

Transductor de fuerza isométrica Panlab conectado a un sistema de digitalización Letica.

III.C.2.- Fármacos y reactivos

Adrenalina y Noradrenalina Braun, de Braun Medical SA, Barcelona.

Dobutamina de Inibsa SA Laboratorios, Barcelona.

Dormicum (midazolam) de Productos Roche SA, Madrid.

Esmerón (rocuronio) de Organón Española SA, Barcelona.

Fentanest (fentanilo) de Productos Roche SA, Madrid.

Forane (isoflurano) de Abbott Laboratories, Madrid.

Hypnomidate (etomidato) de Janssen-Cilag, Madrid.

Imurel inyectable (azatioprina) de Evans Medical España, Madrid.

Plasma-Lyte 148, de Baxter SL, Valencia.

Solu-moderín (metil prednisolona) de Pharmacia & Upjohn SA, Barcelona.

Valium (diazepam) de Productos Roche SA, Madrid.

Via Span de Grupo Bristol-Myers Squibb, Madrid.

Reactivos:

El lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhimurium*, las citocinas y los derivados de la arginina fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, USA) y Roche (Mannheim, Alemania).

Los reactivos para el análisis HPLC se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

Los reactivos para electroforesis fueron de Bio-Rad (Hercules, CA).

III.D.- MÉTODOS

**III.D.1.- TRASPLANTE ORTOTÓPICO DE HÍGADO EN EL
HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN**

El protocolo de los estudios realizados en esta Tesis fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (21 de mayo de 1997 y 20 de mayo de 1998) y todos los pacientes que han participado dieron su consentimiento tras ser informados.

El protocolo clínico de estudio fue idéntico en todos los pacientes durante el estudio.

III.D.1.a.- Donante

Los órganos abdominales se perfundieron a través de la vena porta y de la aorta con solución Via Span a 4 °C. Después de la extracción, el hígado se mantuvo sumergido en la misma solución en una bolsa estéril introducida a su vez en otra bolsa que contenía solución Ringer a la misma temperatura y con hielo picado. Se anotó la edad del donante y si había recibido fármacos vasoconstrictores durante las últimas 24 h antes de la extracción.

III.D.1.b.- Paciente receptor

- Monitorización

Se monitorizó al paciente con electrocardiograma (ECG) continuo, PAM no invasiva y pulsioxímetro hasta la inducción de la anestesia. Después se canalizó una arteria radial para el control continuo de la PAM. Se introdujo un catéter con sensor de temperatura en la arteria pulmonar para la medida de presión venosa central (PVC), presiones en la arteria pulmonar (PAP), presión pulmonar enclavada (PCP), temperatura central y gasto cardíaco (GC). Mediante una fibra óptica del mismo catéter se monitorizó la saturación en sangre venosa mixta.

- Anestesia

La anestesia se indujo con diacepán 0.1 mg/Kg, fentanilo 5 µg/Kg y etomidato 0.3 mg/Kg. Se produjo la relajación muscular para la intubación orotraqueal con rocuronio 2 mg/Kg.

Se ventiló al paciente con un respirador Dräger CICERO con mezcla al 40% de O₂ en aire y concentraciones variables (0-1%) de isoflurano según la situación hemodinámica.

Se mantuvo el sueño del paciente con una perfusión de midazolam 0.05-0.1 mg/Kg/h y la analgesia con fentanilo 2-5 µg/Kg/h.

Control hemodinámico: El objetivo principal fue obtener una PAM (como índice de la presión de perfusión tisular) superior a 60 mm Hg. Para ello se comprobaron en primer lugar las presiones de llenado (PVC y PCP) manteniéndolas entre 10 y 18 mm Hg. Si a pesar de considerar adecuado el llenado la PAM era baja, se administraba dobutamina (comenzando con 5 µg/Kg/min.) cuando el GC era bajo, mientras que si las resistencias vasculares eran bajas se infundía noradrenalina (comenzando con 0.1 µg/Kg/min.).

Definimos el síndrome de reperfusión (SPR60) como la disminución de la PAM, por debajo de 60 mm Hg, durante más de un minuto en los primeros cinco minutos tras la reperfusión (Millis y cols., 1997). El tiempo que duró la disminución de la PAM por debajo de 60 mm Hg se llamó duración del SPR. En caso de aparecer el SPR60, se trató con adrenalina intravenosa en bolos de 0.1 mg que se repitieron si persistía la situación, hasta 1 mg, comprobando siempre que las presiones de llenado fueran adecuadas. Si después de la adrenalina persistía la hipotensión, se administraba noradrenalina.

La reposición de la volemia, incluidos derivados de la sangre, se decidió dependiendo de las presiones de llenado, de las medidas de hemoglobina y hematocrito y de los análisis de coagulación.

Se aportó CaCl_2 para mantener una medida de calcio iónico en plasma entre 0.9 y 1.2 mM.

- Cirugía

Comenzó con la disección para conseguir aislar los elementos del hilio hepático. En primer lugar se clampó la arteria hepática y después la vena porta. En este momento finalizó la fase de disección y comenzó la fase anhepática. Después se disecó la cara posterior del hígado para separarlo de la cava, ligando pequeñas venas retrohepáticas. En la parte superior se buscaron las tres venas suprahepáticas, que se aprovecharon para preparar la boca de la anastomosis del injerto. En todos los casos se realizó un clampaje de cava lateral para cortar las venas suprahepáticas y extraer el hígado patológico. Nunca se empleó by-pass veno-venoso. A continuación se introdujo el injerto en el campo quirúrgico y se realizaron las anastomosis de cava del injerto con la cava del receptor (termino-lateral) y después la de porta del injerto con porta del receptor (termino-terminal). Una vez completadas estas suturas, se lavó el hígado de la solución de

conservación. El lavado se hizo con sangre portal habitualmente: se desclampó la porta y se rellenó el injerto de sangre. Se extrajeron a través de la cava infrahepática del injerto cuatro jeringas de 50 cc marcadas como A, B, C y D secuencialmente. En 8 casos hemos lavado el hígado con Plasma Lyte (solución de agua con 140 mmol/L de sodio, 5 mmol/L de potasio y un pH de 7.4) a través de la porta, con el fin de comprobar si los posibles efectos de las muestras se mantenían evitando posibles repercusiones de la sangre portal. Aunque a efectos del tejido en ese momento se inició la perfusión del injerto, en este trabajo hablamos de reperfusión cuando además se libera el clampaje de venas suprahepáticas, permitiendo el paso a la circulación general de la sangre proveniente del hígado. Después se anastomosó la arteria hepática y la vía biliar y con la revisión de la hemostasia y el cierre de la pared abdominal finalizó la cirugía.

- Toma de muestras biológicas

Antes de poner el injerto en el campo quirúrgico se seccionó una cuña como biopsia del mismo y se congeló a -70° C.

Durante la cirugía se extrajeron varias muestras de sangre para controlar el mantenimiento del paciente. Además específicamente para este trabajo se tomaron varias

muestras de una arteria: 10 min. antes de la reperfusión (R-10), así como 10 y 60 min. tras ella (R10 y R60 respectivamente).

De las 4 jeringas extraídas de la cava infrahepática del injerto en el lavado, se tomaron alícuotas denominadas A, B, C y D, en orden de extracción.

Las muestras R-10, R10, R60, A, B, C y D se centrifugaron 10 min. a 900 x g para obtener el plasma, que se guardó congelado a -20°C.

El tratamiento inmunosupresor se inició inmediatamente tras la reperfusión del injerto, con 1.5 mg/Kg de azatioprina y 15 mg/Kg de metilprednisolona intravenosos.

La función del injerto se evaluó durante los tres primeros días tras el TH, clasificándola en cuatro grupos (Tabla 2). Se definió el grado I cuando la AST permaneció por debajo de 1000 U/L, se produjo un adecuado flujo de bilis (más de 40 ml/día de buena calidad: espesa, amarilla) y mejoró la coagulación en esos tres días. Grado II: la AST inicial superó las 1000 U/L, pero disminuyó en las siguientes 48 h, mejoró la coagulación y el flujo de bilis fue adecuado. Grado III: la AST se estabilizó alrededor de 2500 U/L en las primeras 48 h, la eliminación de bilis fue < 40 ml/día y la coagulopatía no mejoró espontáneamente.

Grado IV: la AST aumentó rápidamente, no se produjo bilis y la coagulopatía fue muy grave (Greig y cols., 1989).

III.D.2.- TÉCNICAS ANALÍTICAS

III.D.2.a.- Análisis de la síntesis del NO en el TH

III.D.2.a1.- Determinación de los niveles de ARNm de la iNOS en las biopsias del injerto y en los cultivos de macrófagos

El ARN total presente en 50 mg de cada biopsia hepática o en los macrófagos cultivados (2×10^6) se obtuvo por el método del tiocianato de guanidinio (Terenzi y cols., 1995). Las muestras se homogeneizaron en un medio que contenía 4 ml de solución D (tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7.0, sarcosil 0.5% y β -mercaptoetanol 0.1 M), 0.4 ml de acetato sódico 2 M y 4.4 ml de fenol bidestilado pH 7, solución en la que las proteínas quedan desnaturalizadas evitando de este modo que las ARNasas puedan degradar el ARN. El homogenado se repartió en tubos eppendorf añadiendo 100 μ l/ml de mezcla Chisam (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1). Para solubilizar el ARN, los tubos se agitaron vigorosamente durante 30s y se mantuvieron en hielo durante 15 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 min. a 4°C en una centrífuga eppendorf tomando la fase superior. Para

precipitar el ARN, se añadió un volumen de isopropanol, manteniendo las muestras 4h a -20°C . Después de la precipitación, las muestras se centrifugaron durante 15 min. y el precipitado de ARN se lavó dos veces con etanol al 75%. Con el fin de determinar la cantidad y calidad del ARN el precipitado se resuspendió en EDTA 1 mM en agua tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC). La muestra se valoró en el espectrofotómetro y se midió su absorbancia a 260, 280 y 310 nm, valores que corresponden, respectivamente, a la cantidad de ARN, proteínas e impurezas presentes en la preparación. La relación entre $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ es un índice de la calidad del ARN, considerándose buenos los valores comprendidos entre 1.7 y 2. Para la extracción del ARN total de los cultivos de macrófagos las células se lavaron dos veces con PBS y se recogieron en 1 ml de solución D, 0.1 ml de acetato sódico y 1.1 ml de fenol, procesándose de la misma manera que las biopsias de tejido.

Para realizar el análisis por Northern blot, se desnaturalizaron alícuotas de ARN total (20-30 μg) a 65°C durante 15 min. en formaldehído 5%, formamida 50%, glicerol 8%, azul de bromofenol 0.4% y cianol xileno 0.4%. Tras la desnaturalización, el ARN total se fraccionó por electroforesis (20 mA, 15h) en un gel de agarosa al 0.9% que contenía formaldehído al 2% y tampón MOPS 1x (MOPS 10x: MOPS 0.2 M, acetato sódico 0.05 M y EDTA 5 mM pH 7.4). Después de transferir el ARN del gel a membranas Nytran NY-13N con SSC

10x (ClNa 1.5 M y citrato sódico 0.3 M pH 7.4) mediante un sistema de vacío de baja presión, las membranas se prehibridaron durante al menos 6h a 42°C, en un medio que contenía formamida 50%, ClNa 0.25 M, fosfato sódico 0.1 M pH 7.2, SDS 7% y ADN de esperma de salmón 0.1%. Transcurrido el tiempo de prehibridación y después de marcar los fragmentos de ADN empleados como sondas con [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) por el método random primed (eficiencia 37-55%) (Amersham) las membranas se hibridaron durante 16h a 42°C. La sonda de iNOS era un fragmento de 860bp (EcoRI/HindII) (Xie y cols., 1992).

El método de marcaje por "random primer" se basa en la hibridación de una mezcla de hexanucleótidos al ADN que se ha de marcar. La cadena complementaria se sintetiza a partir del extremo 3'OH terminal del cebador hexanucleótido utilizando el fragmento de klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. En los hexanucleótidos están representadas prácticamente todas las combinaciones de secuencia, uniéndose de esta forma, el cebador al ADN molde. Los deoxinucleótidos trifosfato marcados con ³²P, presentes en la reacción, se incorporan en la nueva cadena complementaria de ADN sintetizada.

Tras la hibridación, las membranas se lavaron una vez a temperatura ambiente durante 10 min. y dos veces a 42°C durante 30 min. con SSC 0.1x y SDS 0.1%, exponiendo la

membrana a una película Hyperfilm-MP (Amersham). La cuantificación de las señales obtenidas se realizó por densitometría (Molecular Dynamics, Kemsing, UK) utilizando la muestra de 18s ARNr como estándar del control de carga. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias.

III.D.2.a2.- Determinación de los niveles de iNOS proteína por Western blot

Las biopsias hepáticas y las células en cultivo se homogeneizaron (en 1 ml y en 200 μ l, respectivamente) en tampón A (Hepes 10 mM pH 7.9, EDTA 1mM, EGTA 1mM, ClK 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM (fenilmetilsulfonil fluoruro), leupeptina 4 μ g/ml, aprotinina 40 μ g/ml, tosil-lisil-clorometano 2 μ g/ml, FNa 5 mM, NaVO₄ 1 mM, MoO₄Na₂ 10 mM) y Nonidet P-40 al 0.5%. Después de incubar 15 min. a 4°C, los tubos se agitaron 15s y se centrifugaron a 8000g durante 15 min. El sobrenadante se utilizó para el análisis de iNOS. Cantidades iguales de proteína (20-30 μ g) se fraccionaron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes en un gel al 10% de acrilamida/bisacrilamida (SDS/PAGE), según el método descrito por Laemmli en 1970. Previa su aplicación en gel, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min. en el tampón Laemmli (5:1) cuya composición es Tris-ClH 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol 55 y azul de bromofenol 0.001%. El tampón de electroforesis

está compuesto por Tris-ClH 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.01%. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilideno difluoruro HybondTM-PVDF (Amersham) aplicando durante 15h un voltaje de 0.5 mA/cm. El medio de transferencia contenía Tris 25mM, glicina 192 mM y metanol 20% pH 8.3. Después de la transferencia y con el fin de saturar los puntos de unión inespecíficos, las membranas se mantuvieron durante 2h en una solución de leche en polvo desnatada al 3% en PBS (ClNa 135 mM, ClK 2.68 mM, PO₄HNa₂ 8 mM y PO₄H₂K 1.75 mM). Transcurrido este tiempo y tras lavar 4 veces con PBS y Tween 20 al 0.1% (TPBS), las membranas se incubaron 2h a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-iNOS 1:1000 (Santa Cruz Laboratories), las membranas se lavaron con TPBS y se expusieron durante 2h al segundo anticuerpo, una inmunoglobulina G anti-conejo conjugada con peroxidasa. Después de la incubación y de realizar 4 lavados de las membranas (5 min. cada uno), el antígeno se reveló empleando el sistema ECL (Amersham). Se realizaron diferentes tiempos de exposición para asegurar la linealidad de la intensidad de las bandas. Las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

III.D.2.a3.- Análisis de derivados del NO en el lavado del injerto

Se midió indirectamente la producción de NO en el injerto durante la IR por determinación de nitritos y nitratos en la muestra A. Se trataron 250 μ l de muestra A en tubos de Eppendorf de 1.5 ml con 0.5 unidades de nitrato reductasa en presencia de NADPH 50mM y FAD 5 mM (Terenzi y cols., 1995) para reducir los nitratos a nitritos. Tras la oxidación del exceso de NADPH con piruvato 0.2 mM y 1 μ g de lactato deshidrogenasa, se midieron los nitritos con reactivo de Griess (Hortelano y cols., 1995) añadiendo ácido sulfanílico 1mM en HCl 100mM (concentración final). Después de incubar los tubos durante 5 min., se centrifugaron y 150 μ l del sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Tras una primera lectura de la absorbancia a 548 nm, se añadieron 50 μ l (1mM en el ensayo) de naftiletileno diamina, formándose un complejo diazo, cuya absorbancia se determinó a 548 nm, y comparándose con la correspondiente a un patrón de NaNO₂.

III.D.2.a4.- Estudio de la acción sobre el sistema de la NOS de las diferentes muestras tomadas del paciente

- Efecto sobre la eNOS

El análisis de la acción del lavado del injerto sobre la eNOS se estudió en el modelo de contracción-relajación de anillos de aorta (3-5 mm) de conejo. Éstos se obtuvieron de conejos adultos NZW sacrificados bajo anestesia (40 mg/Kg de pentobarbital iv).

Los anillos se sumergieron en una copa de 5 ml de la siguiente solución(mM): NaCl, 139; KCl, 5; CaCl₂, 1.15; MgCl₂, 0.98; glucosa 9; y Hepes 4.99 (37°C, O₂). El registro de contracciones se realizó mediante un transductor de fuerza isométrica Panlab, conectado a un sistema digitalizado Leticia. La preparación se montó con una tensión en reposo de 2 g y se dejó estabilizar durante 90 min., reajustando la tensión a 2 g cuando fue necesario. Tras inducir una contracción submáxima (80 %) con noradrenalina (NA) 10⁻⁶ M, ésta se relajó con dosis crecientes de acetilcolina (Ach, 10⁻⁸ a 10⁻⁵ M) y de forma cruzada en presencia o ausencia del suero de los pacientes (R-10) o del lavado del injerto (A), ambos al 10%, administrados 20 min. antes de la Ach.

Para cada curva dosis-respuesta de la Ach se calculó el efecto máximo (máximo % de relajación de la contracción obtenida con la NA) y el PD₂ (logaritmo negativo de la dosis que consigue el 50% del efecto máximo). Los experimentos en los que la Ach indujo menos del 40% de reducción de la contracción se descartaron, asumiendo que el endotelio no estaba en buenas condiciones. Definimos la variable Relaj-A/Ctrl como la relación (en porcentaje) entre la relajación conseguida en presencia de A y la conseguida en el control .

- Efectos sobre la iNOS

En los cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratón se puede inducir la expresión de la iNOS mediante estimulación con lipopolisacárido (LPS). Añadiendo las diferentes muestras obtenidas de los pacientes trasplantados comprobamos su efecto sobre esta inducción.

Preparación de los macrófagos:

Los macrófagos peritoneales preactivados se prepararon a partir de ratones macho, 4 días después de la inyección intraperitoneal de 1 ml de una solución al 10% de caldo de tioglicolato. Tras retirar la piel de la cavidad abdominal, se inyectaron 50 ml de medio RPMI 1640, se masajeó la zona durante 10 min. y se recuperó el líquido de la cavidad

peritoneal, que fue centrifugado en frío durante 10 min. a 200 g. Se sembraron 2×10^6 células en platos de 6 cm y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado (FCS) por calor y con antibióticos (50µg/ml de penicilina, estreptomina y gentamicina respectivamente) a 37°C y en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Después de 4h de incubación se retiraron las células no adheridas por lavado con PBS y las células adheridas se cultivaron y estimularon con LPS (concentración final 1µg/ml) en presencia o ausencia de las muestras extraídas de cada caso del plasma del receptor (R-10, R10 y R60) y del lavado del injerto con sangre portal o con Plasma Lyte (A,B,C,D), de cada caso de TH. Las muestras se utilizaron a diferentes concentraciones (0.1-15%) y las incubaciones se realizaron en RPMI 1640 sin rojo fenol y con 2% de FCS. También se comprobó el efecto de la solución de preservación de Wisconsin. A los tiempos indicados se determinó la actividad de la iNOS directamente por medida de la producción de citrulina e indirectamente por medida de nitritos por el método de Griess según se ha descrito en el apartado III.D.2.a3.

Definimos la variable NoA como el porcentaje de producción de nitritos en cultivos de macrófago con cada muestra A, respecto a la producción en cultivos control (con LPS y sin plasma de los pacientes).

La medida directa de la actividad de la iNOS en los cultivos de macrófagos estimulados con LPS, se determinó la producción de citrulina marcada con [U¹⁴C] a partir de arginina marcada [U¹⁴C] (Terenzi y cols., 1995). Los macrófagos se incubaron durante 12 h con LPS, en presencia o ausencia de las muestras R-10 ó A y durante otras 6 h con arginina marcada [U¹⁴C] (0.5 µCi, 83 µM). Para medir la producción de citrulina marcada se detuvo la reacción añadiendo 800µL de agua a las placas de cultivo y el homogenado obtenido se pasó a través de una columna DOWEX AG 50W-X8 (forma sódica) (Bio-Rad Lab, Richmond, CA). La citrulina marcada se eluyó con 2 ml de agua y la radioactividad se determinó por espectroscopía de centelleo líquido. La actividad de iNOS se calculó por diferencia entre la cantidad de citrulina liberada en el ensayo en presencia o ausencia de L-N-metil-arginina 0.25 mM. Una unidad de actividad NOS se define como la cantidad de proteína que libera 1 nmol de [U-¹⁴C]-citrulina por minuto.

Análisis de la actividad arginasa y concentraciones de arginina.

Medida de arginasa: La actividad arginasa se determinó por el método de Colombo y cols. (1984). Se calentaron 100 µL de la muestra A a 55°C con Cl₂Mn 10 mM durante 15 min. La actividad de la arginasa se midió a 30°C incubando 50 µL del

extracto con arginina 20 mM en 60 mM de tampón carbonato pH 9.5, en un volumen de 0.5 ml durante 15 min. La cantidad de ornitina sintetizada se midió con ninhidrina en condiciones ácidas, usando una solución de ornitina como estándar.

Se determinaron los niveles de arginina en los cultivos al inicio y al final de la estimulación con LPS en presencia de la muestra A. Se midió la concentración de arginina en las placas por conversión a octopina con octopina deshidrogenasa según la metodología descrita por Gode (1985).

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó utilizando albúmina de suero bovino como patrón por el método descrito por Bradford (1975). Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomasie con los grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos de las proteínas. Los cambios en la absorbancia a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de la proteína presente.

III.D.2.a5.-Estudios con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la determinación de la arginina y derivados metilados en las muestras de lavado del injerto A se utilizó un System Gold High Performance Liquid Chromatography (HPLC) de Beckman. Antes de aplicar la muestra al analizador se procedió a su purificación con el fin de eliminar otros componentes endógenos que pudieran interferir en el análisis. Para ello se realizó una extracción no-polar, procedimiento que es similar a una cromatografía en fase reversa. Se emplearon columnas que contienen C18-octadecil (Scharlau, Barcelona) como matriz, que, como se había demostrado previamente (Vishwanathan y cols., 2000), no retienen los componentes a analizar (arginina ARG, L-N-monometilarginina MMA y dimetilarginina simétrica SDMA y asimétrica ADMA). Antes del paso de la muestra la columna se equilibró con 1 ml de metanol y posteriormente se lavó con 1 ml de agua. Sin dejar secar la columna, se aplicó 1 ml de muestra recogiendo el eluato. Para evaluar la recuperación correcta de los compuestos en esta fracción, se lavó la columna con 1 ml de agua y se pasó nuevamente 1 ml de metanol por la columna. Todas las fracciones recogidas se secaron bajo vacío y se reconstituyeron en 300 µl de un medio que contenía citrato sódico 2%, ClH 1%, tiodiglicol 0.5%, ácido benzoico 0.1% y agua 96% (pH 2). Los extractos reconstituídos se inyectaron

en el analizador de aminoácidos determinando la cantidad de arginina y metabolitos metilados con ninhidrina bajo condiciones ácidas y utilizando una mezcla de estándares de aminoácidos como control. Para preparar los estándares, se añadió a una mezcla comercial de aminoácidos que contiene arginina 74 μM , una solución a la misma concentración del resto de los metabolitos metilados. El analizador toma 300 μl de mezcla, pero tan sólo analiza 135 μl , por lo que detecta 10 nmoles de cada uno de los aminoácidos estándar. Del mismo modo, y como control de la separación, se analizaron independientemente soluciones de arginina y sus metabolitos metilados.

En otra serie de experimentos se utilizó una columna Dowex 50W-X8 (BioRad, Madrid, España), que retiene moléculas cargadas positivamente. Los metabolitos se eluyeron aumentando la concentración de ClNa . Los metabolitos eluidos se ensayaron en el cultivo de macrófagos para determinar su efecto sobre la síntesis de NO.

III.D.2.a6.- Espectrometría de masas

Los extractos de las muestras aislados por HPLC correspondientes a los tiempos de retención de la arginina y sus derivados se analizaron en un espectrómetro de masas. Las masas moleculares de la arginina, monometil-arginina y

dimetil-arginina se determinaron usando un MS MALDI-TOF (Voyager DEST, Perspective Biosystems, Framingham, MA): se liofilizaron los aminoácidos y se disolvieron en una solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 0.1%. El espectro del MALDI se calibró usando estándares internos y la determinación semicuantitativa de los derivados de la arginina se realizó usando estándares externos procesados como se describió para las muestras biológicas.

III.D.2.b.- Formación de MMA y ADMA en hepatocitos

III.D.2.b1.- Cultivos de hepatocitos de rata adulta

Los hepatocitos se obtuvieron por perfusión *in situ* del hígado de ratas de 3 meses de edad, mediante canulación por la vena porta (Díaz-Guerra y cols., 1996), con 40ml/min. de medio Hepes sin calcio (Hepes 20 mM, ClK 1 mM, SO₄Mg 1 mM, fosfato potásico 5 mM, ClNa 150 mM y glucosa 10 mM pH 7.4). Tras pasar unos 300 ml de medio para lavar el hígado, se añadió a los 100 ml restantes, 40 mg de colagenasa (0.15U/mg) y ClCa₂ 1mM (Hue y cols., 1978). Después de 20 min. de perfusión con colagenasa, la suspensión celular se filtró a través de varias capas de gasas y se centrifugó durante 5 min. a 50g lavando dos veces. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo de Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) y se sembraron 2x10⁶ células en platos de cultivo de 6 cm con

suero fetal bovino al 10% y con 50 µg/ml de gentamicina, penicilina G y estreptomina respectivamente. Tras una noche de incubación a 37° C, el medio se aspiró y los platos se lavaron con PBS para retirar las células no adheridas. Los cultivos se mantuvieron en diferentes medios de cultivo con un 2% (vol:vol) de albúmina de suero bovino. También se realizaron estos cultivos de la misma forma pero incubándolos a 4°C y sellados para evitar el contacto con la atmósfera.

En los cultivos se midió la producción de derivados de la arginina por HPLC (II.D.2.b1).

III.D.3.- ANÁLISIS DE LOS DATOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Con todos los datos clínicos y de laboratorio registrados se confeccionó una base de datos con el programa SPSS 9.0.1 para Windows. Con el mismo programa se buscaron relaciones estadísticas entre las diferentes variables:

Se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar el ajuste de la distribución de datos de cada variable a una distribución normal.

Para comparar medias entre dos o más grupos independientes se usaron el test de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis respectivamente.

Para comprobar relaciones significativas entre dos variables se calculó el factor de correlación de Spearman.

Para estudiar tablas de contingencia de 2x2 se usó el test de la X^2 con la corrección de Yates. En tablas de contingencia de 2x2 con valores esperados menores de 5 en cualquier casilla se calculó el test exacto de Fisher. La X^2 de Pearson se empleó en tablas de contingencia mayores de 2x2.

Para identificar grupos homogéneos de pacientes se realizó un análisis multivariante (análisis jerárquico de *clusters*) en el Centro de Proceso de Datos de la Universidad Complutense de Madrid con el programa Digital equipment corporation Openums Alpha versión V7.1.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar salvo que se indique lo contrario. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

Se estudiaron un total de 77 pacientes sometidos a TH en el Hospital Gregorio Marañón. Sus características aparecen en la Tabla 4.

IV.A.- Resultados clínicos

IV.A.1.- Donantes

Los donantes de órganos tuvieron una edad media de 34 ± 17 (rango 13-66).

El 89,6% (69) de los donantes habían sido tratados con vasoconstrictores en las 24 h previas a la extracción.

IV.A.2.- Pacientes receptores

En dos pacientes falló la impresora durante la reperfusión por lo que se excluyeron para el análisis del SPR. Se diagnosticó un SPR60 en 39 pacientes (52%) (Tabla 5). La duración del SPR60 fue de $5,6 \pm 6$ min (rango 1-35). Se administró adrenalina 0,1 mg en 35 casos. En 5 de ellos se normalizó la PAM repitiendo los bolos de adrenalina hasta

0,4 mg. En otros 5 pacientes la hipotensión no se solucionó con 1 mg de adrenalina, por lo que se añadió una perfusión de noradrenalina.

Tabla 5.- Incidencia de SPR y grado de función precoz del injerto.

SPR60	n	(%)
SÍ	39	(52)
No	36	(48)
Grado de función hepática		
I	40	(53.3)
II	19	(25.3)
III	12	(16)
IV	4	(5.3)

El resultado del análisis del grado de función precoz del injerto basado en la medida del tiempo de protrombina, concentración de AST y flujo de bilis en los primeros tres días tras el trasplante (Tablas 5 y 6), fue el siguiente: 40 pacientes con Función I (53.3%), 19 con Función II (25,3%), 12 con Función III (16%) y 4 con Función IV (5,3%). En dos pacientes no se pudo determinar la función porque fallecieron

en las primeras 48 h tras el TH, por lo que se excluyeron del estudio de esta variable.

Tabla 6.- Datos de función precoz del injerto. Media \pm DS.

DÍA	AST (U/l)	TIEMPO DE PROTROMBINA (% del control)	BILIS (ml/día)
1	1263 \pm 1100	40 \pm 15	145 \pm 100
2	1285 \pm 2100	55 \pm 16	109 \pm 63
3	650 \pm 790	66 \pm 17	108 \pm 59

IV.B.- TÉCNICAS ANALÍTICAS

IV.B.1.- Análisis de la síntesis del NO en el TH

IV.B.1.a.- Análisis de los niveles de ARNm de la iNOS en las biopsias del injerto

El análisis mediante Northern y Western blot de 16 biopsias extraídas antes de la reperfusión del injerto demostró la ausencia de transcripción (mARN) y de la proteína iNOS, independientemente de la función posterior del injerto.

IV.B.1.b.- Análisis de derivados del NO en el lavado del injerto

Se midió en 6 casos la concentración de nitritos y nitratos (metabolitos del NO) en el lavado del injerto (A), comprobando que no aumenta respecto a la concentración medida en la solución de Wisconsin y siempre fue inferior a 50 μM .

IV.B.1.c.- Estudio de la acción sobre el sistema de la NOS de las diferentes muestras tomadas del paciente

IV.B.1.c1.- Efecto sobre la eNOS

El efecto inicial de la muestra A fue aumentar ligera y transitoriamente la tensión de los anillos de aorta (Figura 5). Al añadir al baño acetil-colina (Ach) en concentraciones crecientes, los anillos de aorta se relajaron progresivamente, sin existir diferencias significativas entre la relajación conseguida en los anillos control y en los anillos cuyo baño contenía la muestra R-10 (Tabla 7).

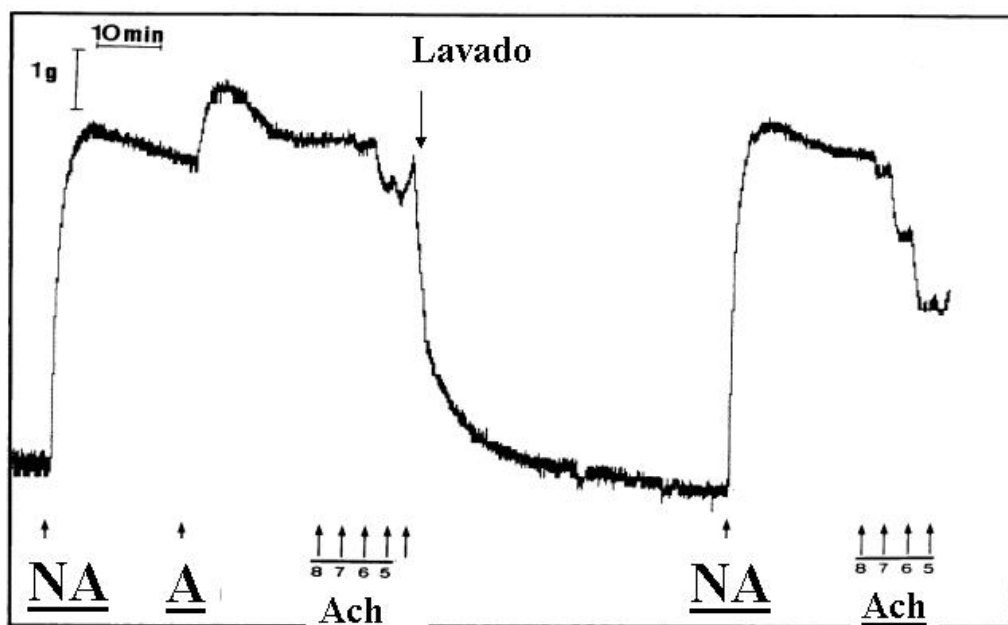
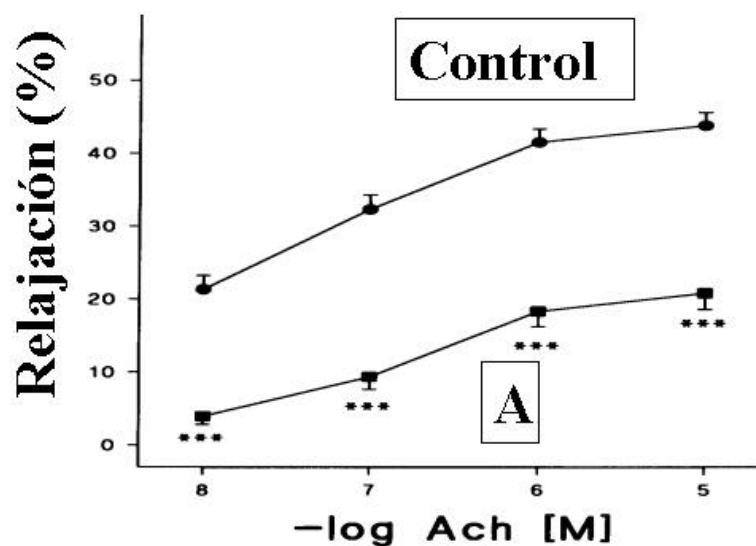


Figura 5.- Gráfico representativo de los cambios de tensión en un anillo de aorta. NA: noradrenalina. A: muestra A al 10% de concentración en el baño. Ach, acetilcolina. Las cifras representan el logaritmo negativo de la concentración molar de Ach en el medio.

Tabla 7.- Relajación por la Ach de anillos de aorta precontraídos con noradrenalina 1 μ M, en presencia de la muestra R-10 ó sin ella. n=20.

Muestra	Efecto relajante máximo (%)	PD₂ de la relajación
R-10	51.8 \pm 3.7	6.48 \pm 0.12
Control	52.8 \pm 3.6	6.77 \pm 0.09

Por el contrario, el efecto de la Ach fue significativamente menor en presencia de la muestra A (44 \pm 20% respecto a la relajación conseguida en la curva control) (efecto máximo 20.8 \pm 2.2 vs 43.8 \pm 1.8%, p<0.001; PD₂ 6.75 \pm 0.07 vs 7.15 \pm 0.08, p<0.01) (Fig. 5 y 6). La relajación conseguida con Ach fue normal en presencia de la muestra A sólo en un caso de los 20 pacientes estudiados.



*Figura 6.- Porcentaje de relajación conseguido en anillos de aorta precontraídos con noradrenalina 1 μ M: curva control (círculos); curva con la muestra A (cuadrados). Media \pm error estándar de la media (***) $p < 0.001$).*

El orden de realización del ensayo (curva control antes o después de la curva con R-10 ó con A) no alteró el resultado, lo que sugiere la reversibilidad de la acción observada.

IV.B.1.c2.- Efectos sobre la iNOS

IV.B.1.c2.a.- Producción de nitritos en los cultivos de macrófagos peritoneales.

Los cultivos primarios de macrófagos peritoneales control (sin LPS) produjeron 5.2 ± 0.4 μM nitrito/placa . Al estimular las células con LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ (concentración final) durante 18 h aumentó la síntesis a 15.4 ± 1.1 μM nitrito/placa.

Al incubar los cultivos de macrófagos con diferentes diluciones de las muestras de lavado del injerto hepático en presencia de LPS, observamos una disminución importante en la producción de nitritos (Figura 7). Una dilución al 10% produce una inhibición completa, siendo el 3% la dilución que da lugar a la inhibición media.

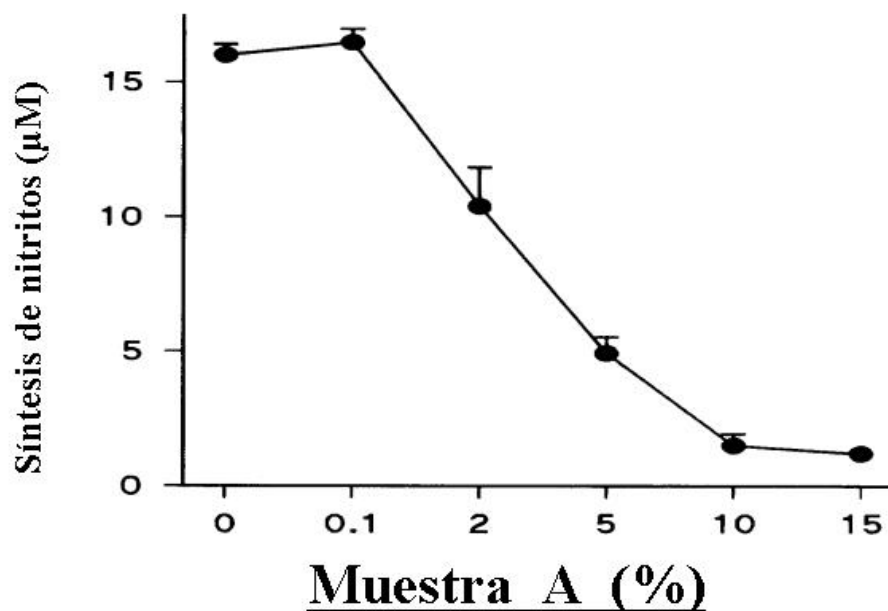


Figura 7.- Inhibición de la actividad iNOS en cultivos de macrófagos peritoneales estimulados con LPS en presencia del lavado del injerto hepático A. Los macrófagos (2×10^6 células) se mantuvieron en cultivo durante 18h en presencia de LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y diferentes concentraciones de A, determinando la liberación de nitritos. Media \pm error estándar de la media en 7 ensayos.

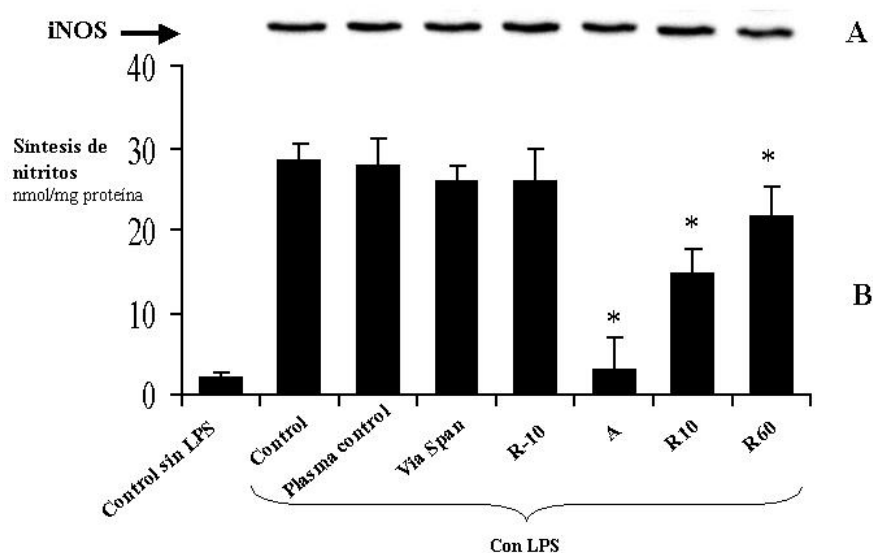


Figura 8.- Presencia de un inhibidor de la iNOS en el lavado del injerto. Síntesis de nitritos (Sección B) en cultivos de macrófagos: efecto del estímulo con lipopolisacárido (LPS), de la solución de preservación (Via Span), de plasma de individuos sanos (control) y de las muestras del paciente (diluidas al 10%) antes de la reperfusión (R-10) o tras ella (R+10, R+60), o del lavado del injerto (A) (n = 7 casos seleccionados con función grados III o IV). Tras la incubación durante 18 h se prepararon extractos de las proteínas de los macrófagos y los niveles de iNOS expresada se determinaron por Western blot (Sección A).
* p < 0.01 respecto a muestra R-10.

En la Figura 8 (Sección B) se observa que la síntesis de NO en los cultivos de macrófagos no varía cuando tratamos las células estimuladas con LPS con plasma extraído del paciente antes de la reperusión del injerto (R-10). Las muestras R+10 y R+60 dieron lugar a una disminución de la producción de NO pequeña, pero significativa (respecto a R-10). Cuando las células estimuladas con LPS se incubaron con el lavado del injerto A al 10% (vol:vol), la inhibición en la producción de nitritos fue muy significativa. En la misma figura (Sección A) comprobamos que los niveles de expresión de la iNOS se mantienen constantes frente al estímulo con LPS independientemente de la presencia de las diferentes muestras en el cultivo.

Cuando se añadió la muestra A extraída de los 8 injertos lavados con Plasma-Lyte (en lugar del lavado habitual con sangre) a los cultivos de macrófagos estimulados con LPS, medimos una producción de nitritos disminuída sin diferencia respecto a los casos de lavado con sangre.

IV.B.1.c2.b.- Análisis de la reversibilidad de la inhibición de la iNOS

En la Figura 9 se muestra la caracterización de la inhibición de la actividad iNOS por la muestra A. Los macrófagos se trataron con LPS y con la muestra R-10 o el lavado A (diluídas al 10% vol:vol) y se determinó la acumulación de nitritos en el medio de cultivo a los tiempos indicados. Como se puede observar, R-10 no inhibe la síntesis de NO (círculos blancos). La adición de la muestra A a tiempo 0 inhibe completamente la liberación de nitritos (triángulos negros). Cuando se añade la muestra A a las 6 h (círculos negros) también inhibe la síntesis de NO. Después de lavar el cultivo para eliminar A, se recupera la producción de nitritos (triángulos blancos), indicando que el lavado del injerto inhibe la actividad de la iNOS sólo cuando está presente en el medio de cultivo y que la inhibición, por tanto, es reversible.

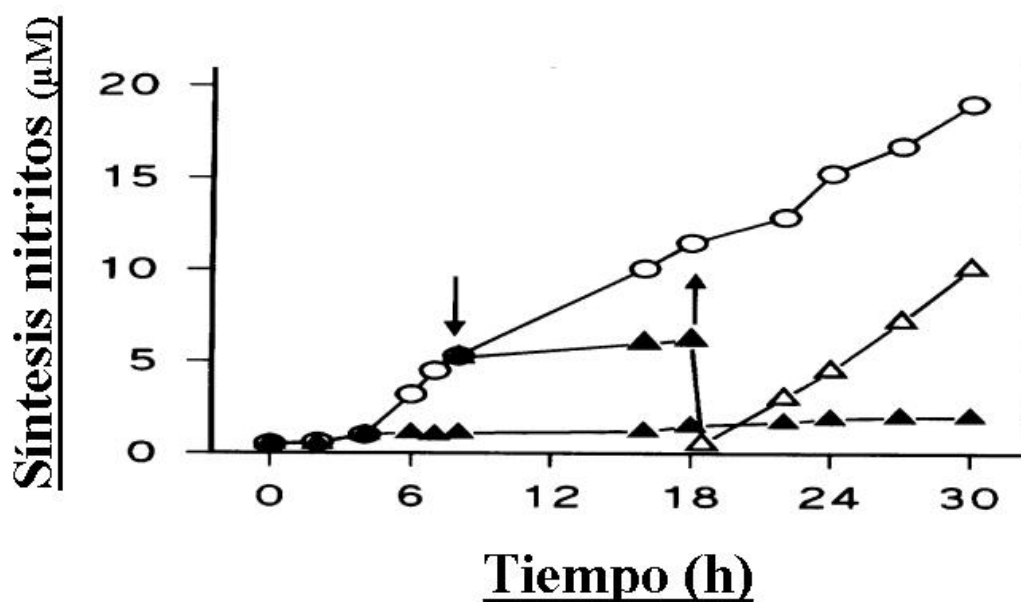


Figura 9.- Reversibilidad de la inhibición de iNOS por el lavado del injerto A en los macrófagos estimulados con LPS. Se determinó la producción de nitritos en el medio de cultivo a los tiempos indicados. LPS y R-10 al 10% (círculos blancos), LPS y la muestra A (triángulos negros). Adición de la muestra A, 6 horas tras el inicio del cultivo con LPS (flecha hacia abajo) y eliminación de la muestra A por lavado del cultivo (flecha hacia arriba), añadiendo de nuevo LPS (triángulos blancos).

IV.B.1.c2.c.- Medida de la actividad de la iNOS por producción de citrulina a partir de arginina

La reversibilidad de la inhibición de la muestra A también se determinó por la medida de la síntesis de citrulina a partir de arginina marcada con ^{14}C como se describe en métodos. Como se observa en la figura 10, se obtuvieron los mismos resultados cuando la actividad de iNOS se analizó por la formación de nitritos y nitratos o por la medida de la síntesis de ^{14}C citrulina. La actividad de iNOS en los cultivos de macrófagos estimulados con LPS y tratados con la muestra R-10 no varía. En cambio la muestra A reduce significativamente la actividad. Una vez que se retira la muestra A por lavado, los macrófagos producen ^{14}C citrulina de nuevo (Figura 10).

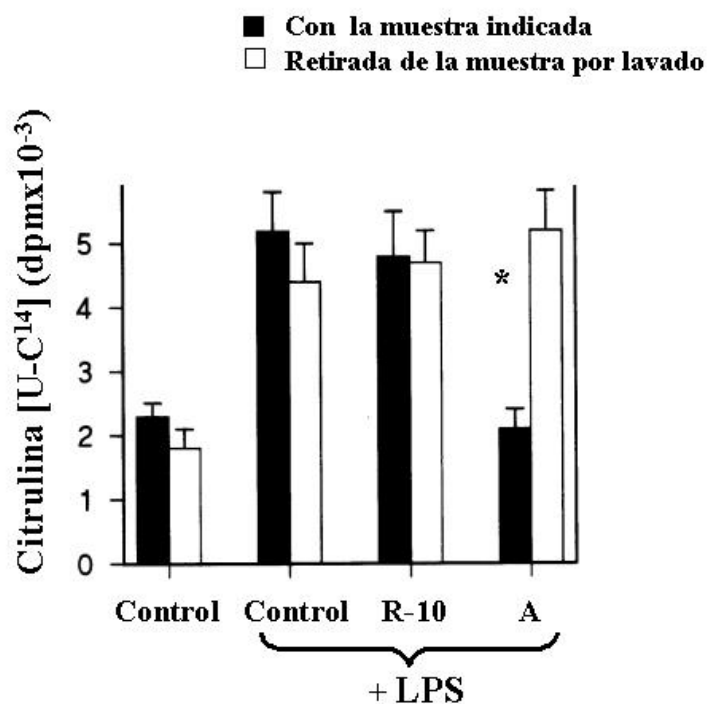


Figura 10.- Inhibición de la síntesis de ¹⁴C citrulina en macrófagos estimulados con LPS por el lavado del injerto A. Las células se incubaron durante 12h con las muestras indicadas y tras eliminar el medio de cultivo, se reemplazó por medio nuevo que contenía arginina marcada con (barras negras) o sin (barras blancas) R-10 o A. La incubación continuó 6 h. más y se determinó la síntesis de ¹⁴C citrulina. Media \pm error estándar de la media en cinco experimentos. * $p < 0.01$.

IV.B.1.c2.d.- Efecto sobre la expresión de la iNOS

Cuando se analizaron los niveles de ARNm de iNOS en macrófagos estimulados con LPS, se observó un incremento significativo. La adición de la muestra A en ausencia de LPS dio lugar a un pequeño incremento en los niveles de ARNm y cuando las células se trataron con LPS y A el incremento fue mayor (Figura 11). Estos resultados sugieren que la disminución de la síntesis de NO se debe a una inhibición de la actividad de la iNOS y no a un efecto transcripcional.

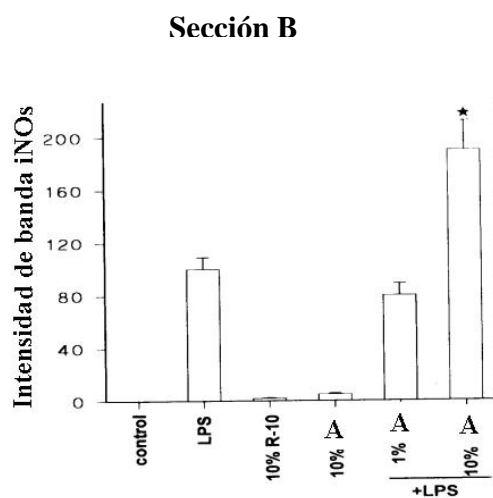
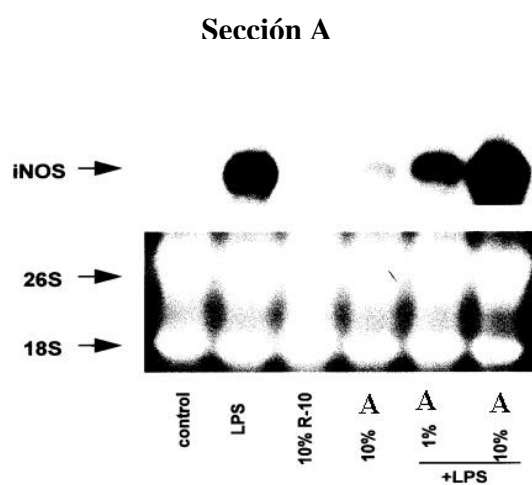


Figura 11.- Niveles de ARNm de la iNOS en los cultivos de macrófagos:
 control, tratados con LPS 1µg/ml, R-10 al 10%, A al 1 ó 10%, o combinaciones de
 A y LPS. Los macrófagos se trataron con las muestras indicadas y al cabo de 6 h.
 el ARN total se extrajo y se analizó por Northern blot (Sección A) con una sonda
 de iNOS. Sección B: Intensidad de las bandas después de normalizar con el
 contenido de ARN ribosomal. * $p < 0.001$ respecto a LPS.

IV.B.1.c2.e.- Análisis de la actividad arginasa en el lavado. Medida de la arginina en los cultivos de macrófagos.

Al analizar la actividad arginasa en 5 muestras A de lavado del injerto, encontramos medidas notablemente elevadas (Tabla 8) y mayores que en R-10. Con la concentración inicial de arginina habitual de los cultivos de macrófagos (1 mM), la concentración final es igual en el cultivo que contiene la muestra R-10 y en el que contiene la muestra A. Sin embargo, en esta última detectamos una actividad de la arginasa diez veces superior. Para asegurar que la disponibilidad de arginina no era un factor limitante en la síntesis de NO, se incrementó la concentración inicial de arginina hasta 10 mM (Tabla 8). A pesar de este exceso de arginina, persiste la disminución de la producción de nitritos cuando en el medio se encuentra la muestra A, lo que indica que la inhibición de iNOS no se debe a una ausencia de arginina en el medio.

Tabla 8.- Actividad de la arginasa y medida de arginina en la muestra pre-reperfusión (R-10) y en el primer lavado del injerto (A). La concentración de arginina se determinó en el medio de cultivo de macrófagos al final del experimento (18 h). (media \pm error estándar de la media; n=5). * $p < 0.05$ respecto a la medida con R-10.

Muestras	Actividad de arginasa U/L	Cultivos de macrófagos		
		[arg] _{inicial} = 1 mM	[arg] _{inicial} =10 mM	[arg] _{inicial} = 10 mM
		[arg] _{final} (mM)	[arg] _{final} (mM)	Síntesis de nitritos (μ M)
R-10	403 \pm 135	0.44 \pm 0.09	8.1 \pm 0.5	18.3 \pm 1.1
A	4632 \pm 1211 *	0.39 \pm 0.06	6.9 \pm 0.4	4.2 \pm 0.7 *

IV.B.2.- Identificación de los inhibidores de la iNOS en las muestras de lavado del injerto

Al pasar las muestras de lavado A por columnas Dowex se observó (Figura 12) que sólo la parte retenida en la columna (con moléculas con carga positiva) era capaz de inhibir la iNOS en los cultivos de macrófagos estimulados con LPS,

mientras que la fracción no retenida era inactiva en el ensayo biológico.

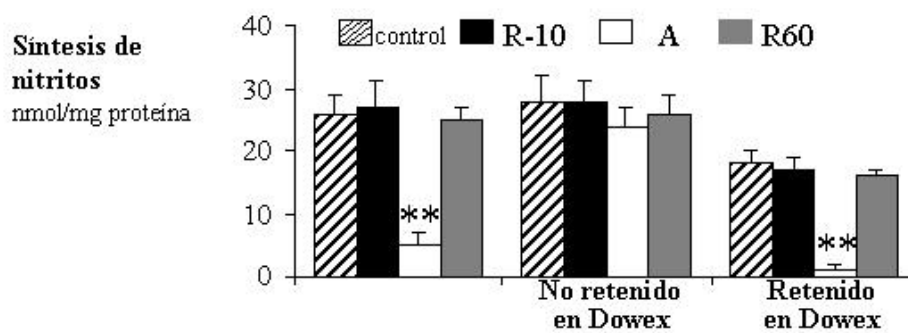


Figura 12.- Análisis de las diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de las muestras de trasplante sobre la *iNOS* en cultivos de macrófagos estimulados con LPS. $n = 16$.

** $p < 0.005$ vs R-10.

IV.B.2.a.- Identificación de estructuras químicas

IV.B.2.a1.- Estudios con HPLC

Como se describió en material y métodos se purificaron las muestras antes de pasarlas por el HPLC. Comprobamos que por HPLC se pudieron separar los diferentes aminoácidos y, además, los derivados metilados de la arginina así como sus estereoisómeros (Figura 13). Los derivados metilados de la arginina ADMA, SDMA y MMA se separan con un tiempo de retención de 44.1, 45.2 y 49.3 min. respectivamente.

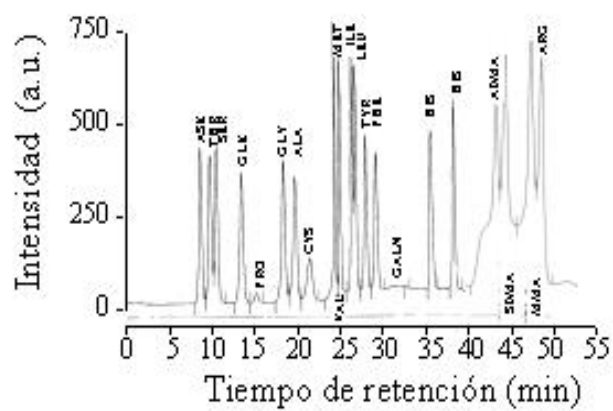


Figura 13.- Cromatograma con los estándares de aminoácidos y los derivados metilados de la arginina.

Para estos estudios con HPLC se utilizaron sólo las muestras de pacientes con una función deficiente del injerto (grados III o IV). Como se observa en la Figura 14, las muestras obtenidas previamente a la presencia del injerto hepático (R-10) contienen cantidades muy pequeñas de estas sustancias. En las muestras del primer lavado (A) observamos altas concentraciones de ADMA (n=14, ADMA 677 ± 405 , rango 249-1637 μM). También encontramos una ligera elevación de la SDMA. En dos casos se encontró una ligera elevación de la MMA: 13.5 μM y 13.7 μM . En las muestras R10 disminuye la concentración de los tres derivados metilados.

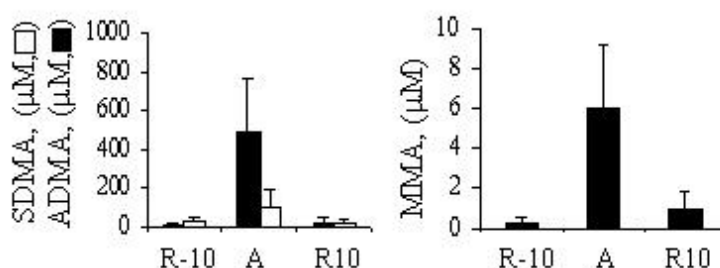
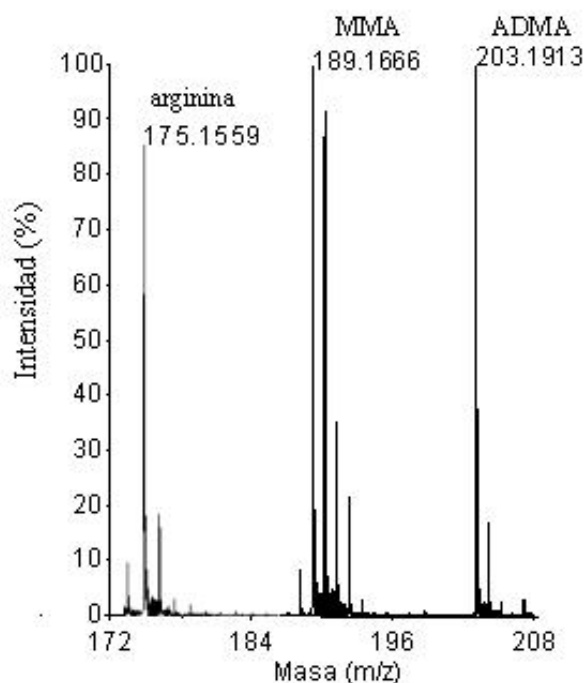


Fig 14.- Identificación y medida de derivados metilados de la arginina. Tras una purificación previa se determinó por HPLC la presencia de ADMA, SDMA y MMA (tiempos de retención de 44.1, 45.2 y 49.3 respectivamente) en las muestras pretrasplante (R-10), de lavado del injerto (A) y tras la reperusión del mismo (R10). Los resultados se muestran como media \pm DS. Obtenidos de 5 casos con injertos con función deficiente (grados III o IV).

IV.B.2.a2.- Estudios con espectrometría de masas

Para identificar la estructura química de los supuestos derivados metilados de la arginina observados por HPLC, tomamos muestras de lavado A de injertos con función III o IV, aislamos los picos correspondientes a MMA y ADMA y los estudiamos en un espectrómetro de masas (Figura 15). Confirmamos así la presencia de MMA y ADMA en dichos lavados del injerto.



Mezcla de muestras de lavado A (Función III o IV)

aminoácido:	arginina	MMA	ADMA
intensidad (%)	5	11	47
masa (m/z)	175.160	189.201	203.174

Figura 15.- Espectro de masas correspondiente a estándares de arginina y sus derivados. Masas de una mezcla de 5 muestras de lavado A de injertos con función III o IV.

IV.B.2.b.- Titulación del efecto inhibitor de las metilargininas sobre iNOS en presencia de concentraciones prefijadas de arginina sobre los cultivos de macrófagos estimulados con LPS

El efecto de la ADMA y de la MMA sobre los cultivos de macrófagos estimulados con LPS se comprobó añadiendo concentraciones crecientes de estándares comerciales de cada una de las metilargininas (Figura 16 secciones A y B). Para evaluar el efecto de las metilargininas contenidas en el lavado del injerto sobre los cultivos de macrófagos, empleamos la fracción extraída por HPLC con un tiempo de retención comprendido entre 40 y 50 min. (que contiene ADMA, SDMA y MMA), de muestras de lavado A de pacientes con función deficiente (grados III o IV) (Figura 16 sección C). Para comprobar la posible influencia de la arginasa se realizó el ensayo con dos concentraciones de arginina (0.2 y 2 mM). Observamos que la muestra R-10 no altera la síntesis de nitritos. En cambio la muestra de lavado A inhibe el 83% de la actividad de la iNOS en presencia de arginina 0.2 mM. En este momento determinamos por HPLC la concentración de metilargininas en el medio: MMA: 5 μ M, ADMA: 177 μ M y SDMA 51 μ M. La inhibición se reduce al 25% en presencia de arginina 2 mM.

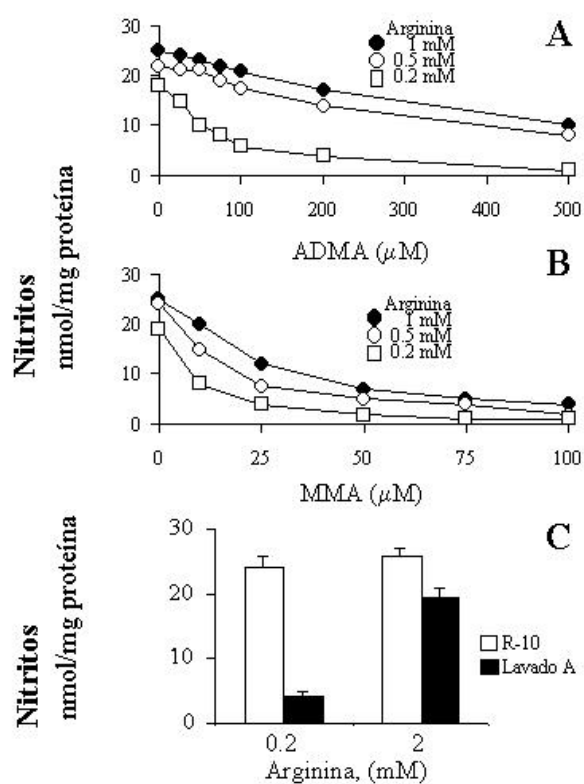


Figura 16.- Efecto de las metilargininas del lavado del injerto A sobre la iNOS. Los cultivos de macrófagos se trataron con las concentraciones indicadas de arginina, ADMA (Sección A) o MMA (Sección B) y con LPS ($1\mu\text{g/ml}$) durante 18 horas. Se midió la síntesis de nitritos. Se estudió la capacidad de inhibición de la iNOS por la fracción de retención de 40 a 50 min en HPLC (que contiene la ADMA y la MMA) de las muestras R-10 y A de pacientes con función III o IV ($n=3$)(Sección C). Se añadió arginina hasta obtener concentraciones en los cultivos de 0.2 ó 2 mM.

IV.B.2.c.- Formación de MMA y ADMA en hepatocitos

Para comprobar la capacidad de los hepatocitos para generar derivados metilados de la arginina empleamos cultivos de hepatocitos de rata adulta. Como se observa en la Tabla 9, al cultivar los hepatocitos a 37 °C durante 24 h no se libera ADMA al medio de cultivo. Sin embargo el cultivo durante 24 h a 4°C sin permitir el recambio de aire y por lo tanto manteniendo el cultivo en condiciones parecidas a la isquemia sí que induce la liberación de ADMA aunque no altera la viabilidad celular (determinada por azul trypan) en el cultivo. Además, si el cultivo en condiciones parecidas a las de la isquemia fría se realiza en ausencia de arginina, observamos que se libera una cantidad todavía mayor de ADMA, lo que indica que no se precisa arginina en el medio de cultivo para que los hepatocitos formen ADMA.

Tabla 9 .- **Acumulación de ADMA en cultivos de hepatocitos de rata adulta.** Concentraciones de ADMA obtenidas cultivando aproximadamente 3×10^6 hepatocitos. Los cultivos mantenidos a 4 °C se sellaron para evitar la ventilación durante 24 h. Los resultados muestran la concentración final de ADMA medida por HPLC (media \pm SD de tres experimentos). * $p < 0.01$ respecto a la incubación a 37°C. + $p < 0.05$ respecto a DMEM con arginina. La viabilidad celular se determinó por exclusión con azul Trypan (media; $n=3$).

Medio de cultivo	Incubación a 37 °C		Incubación a 4 °C	
	24 h con ventilación		24 h sin ventilación	
	ADMA	Viabilidad	ADMA	Viabilidad
	mmol/mg proteína	%	mmol/mg proteína	%
F-12	0.05	94	0.64 ± 0.07 *	88
DMEM	<0.01	86	0.14 ± 0.02 *	83
Via-Span	<0.01	86	1.6 ± 0.1 *	87
DMEM sin arginina	<0.01	91	5.2 ± 0.2 *+	88

IV.C.- Relación entre los datos clínicos del TH y la producción de nitritos en cultivos con la muestra A (NoA)

A continuación estudiamos la relación entre el grado de producción de nitritos en los cultivos de macrófagos tratados con la muestra A y LPS (variable NoA) y los datos clínicos del TH.

IV.C.1.- Relación entre NoA y los datos del donante

No existió correlación estadísticamente significativa entre la edad ($p=0.3$) o la administración de fármacos vasoconstrictores al donante ($p=0.2$) y la NoA.

IV.C.2.- Relación entre la NoA y el tiempo de isquemia del injerto

Existe una correlación significativa entre la NoA y el tiempo de isquemia (Rho de Spearman $r=-0.28$, $p=0.02$). La ONT ha establecido que los injertos que sufren un tiempo de isquemia inferior a las 6 horas tienen una supervivencia significativamente mayor que el resto (Datos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT): 4ª Memoria 1984-2000). Por ello dividimos los casos según el tiempo de

isquemia (inferior a 6 h o igual o superior a 6 h) y observamos una diferencia significativa, con una mayor inhibición en el grupo con mayor tiempo de isquemia (Tabla 10).

Tabla 10.- Relación entre el tiempo de isquemia y la NoA. Media \pm desviación típica. * $p = 0.02$.

Tiempo de isquemia (min.)	NoA (%)
≥ 360	32 ± 31 *
< 360	63 ± 32

IV.C.3.- Relación entre la NoA y los datos preoperatorios del paciente receptor

No encontramos relación estadísticamente significativa entre las características del receptor (edad ($p=0.4$), sexo ($p=0.1$), diagnóstico ($p=0.8$), grado Child-Pugh en las cirrosis ($p=0.3$)) y la variable NoA.

IV.C.4.- Relación entre la NoA y el SPR

La NoA es menor en los pacientes en los que diagnosticamos SPR60, pero sin alcanzar significación estadística (Tabla 11).

Tabla 11.- Relación entre la hipotensión en la reperfusión (SPR) y el porcentaje de síntesis de nitritos respecto al control. Mann Whitney $p=0.06$

SPR60	NoA (%)
Sí	29.1 ± 29.6 p = 0.06
No	41.2 ± 32.1

Dividiendo la muestra según la producción de nitritos (superior o inferior al 50% del control), parece confirmarse la asociación entre el diagnóstico de SPR60 y una mayor capacidad de inhibición de la iNOS por la muestra A (Tabla 12 y Figura 17). Idénticos resultados se obtuvieron usando como punto de corte la media global de la NoA (35%).

Tabla 12.- Diferencia en la incidencia de hipotensión (SPR60) entre los grupos de pacientes con bajo o alto NoA. χ^2 $p=0.03$.

	NoA \leq 50	NoA $>$ 50	Total
SPR60	n	n	n
Sí	33	6	39
No	16	20	36
Total	49	26	75

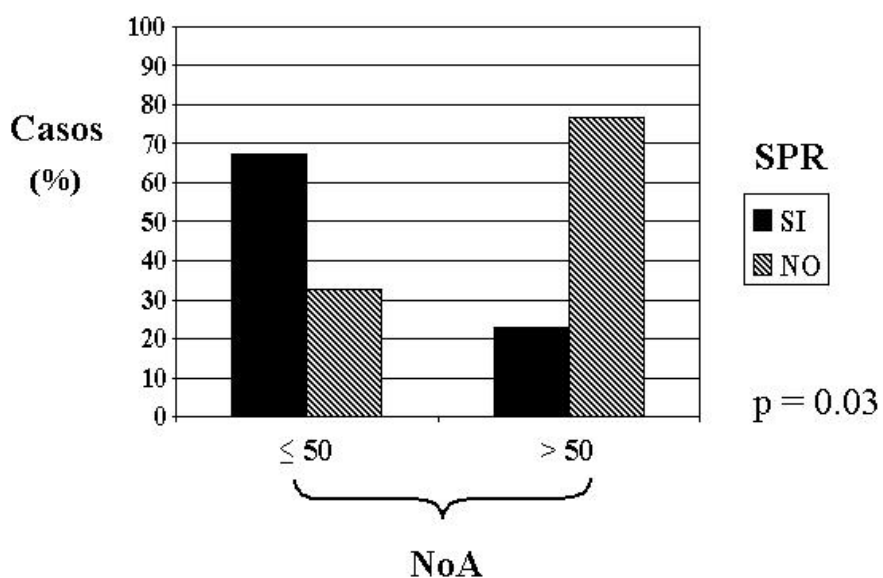


Figura 17.- Incidencia de SPR60 respecto a la producción de nitritos en cultivos de macrófagos con la muestra A (NoA).

La PAM mínima registrada en los 5 minutos siguientes a la reperfusión fue de 53 ± 13 mm Hg. La correlación entre la NoA y la PAM mínima tras la reperfusión fue significativa ($p=0.02$, $r=0.37$), con tendencia a disminuir la tensión al aumentar la inhibición (Figura 18).

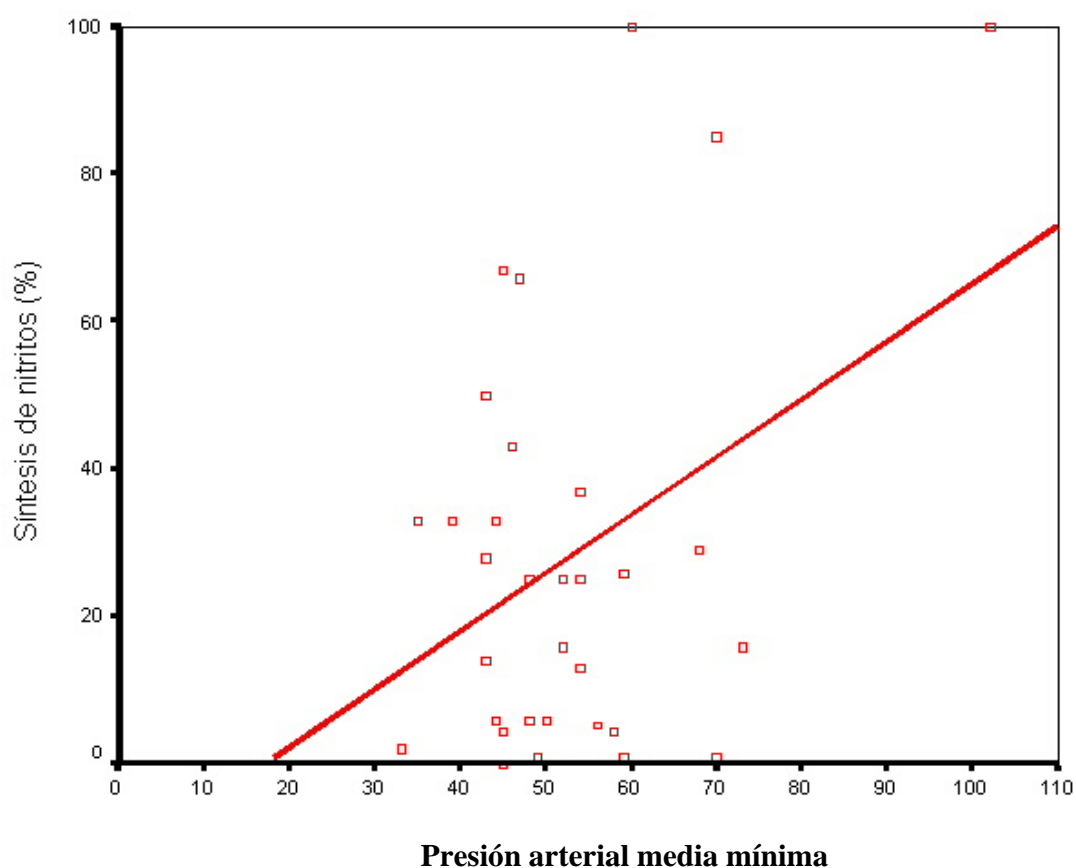


Figura 18.- Relación entre la PAM mínima registrada durante los 5 min. tras la reperfusión y la NoA ($r=0.37$, $p=0.02$).

IV.C.5.- Relación entre la NoA y las presiones pulmonares

Las PAP aumentaron en la reperfusión (7 ± 4 la sistólica, 6 ± 4 mm Hg la diastólica) excepto en tres casos en los que no variaron respecto a las anotadas inmediatamente antes de la reperfusión y un caso en el que disminuyó 2 mm Hg la PAP sistólica y 1 mm Hg la PAP media. No encontramos correlación entre las presiones pulmonares sistólica ni media tras la reperfusión y la NoA.

IV.C.6.- Función precoz del injerto

Estudiamos la función del injerto mediante la determinación diaria de la AST, del tiempo de protrombina y de la producción de bilis. Estos datos se registran durante los primeros tres días tras el trasplante. Además del análisis individual de estas variables, las integramos también para determinar cuatro grados de función aplicando la escala del Grupo de Toronto (Greig y cols., 1989).

Clasificando a los pacientes por su grado de función del injerto encontramos diferencias significativas (Kruskal Wallis $p=0.004$) en la capacidad de inhibición de la iNOS. Aparece una tendencia a aumentar la inhibición en los casos

con peor función: en los casos con función IV comprobamos una inhibición de la iNOS superior al 90% (Tabla 13, Figura 19).

En el análisis jerárquico, en busca de grupos de casos identificados por datos similares, conseguimos identificar un grupo de 11 pacientes caracterizados por tener una baja capacidad de inhibición de la iNOS (NoA 91 ± 8 frente a 37 ± 32 del total de nuestra población, $p < 0.001$), por haber sufrido un tiempo de isquemia bajo (376 ± 84 vs. 515 ± 169 global, $p = 0.007$) y por tener una excelente función precoz (grado I) en el 81% (global 51%, $p = 0.032$).

Tabla 13.- Relación entre el grado de función hepática y la capacidad de inhibición de la iNOS de la muestra A. $p = 0.004$

Función del injerto	NoA
I	44 ± 31
II	23 ± 29
III	31 ± 26
IV	6.2 ± 4.9

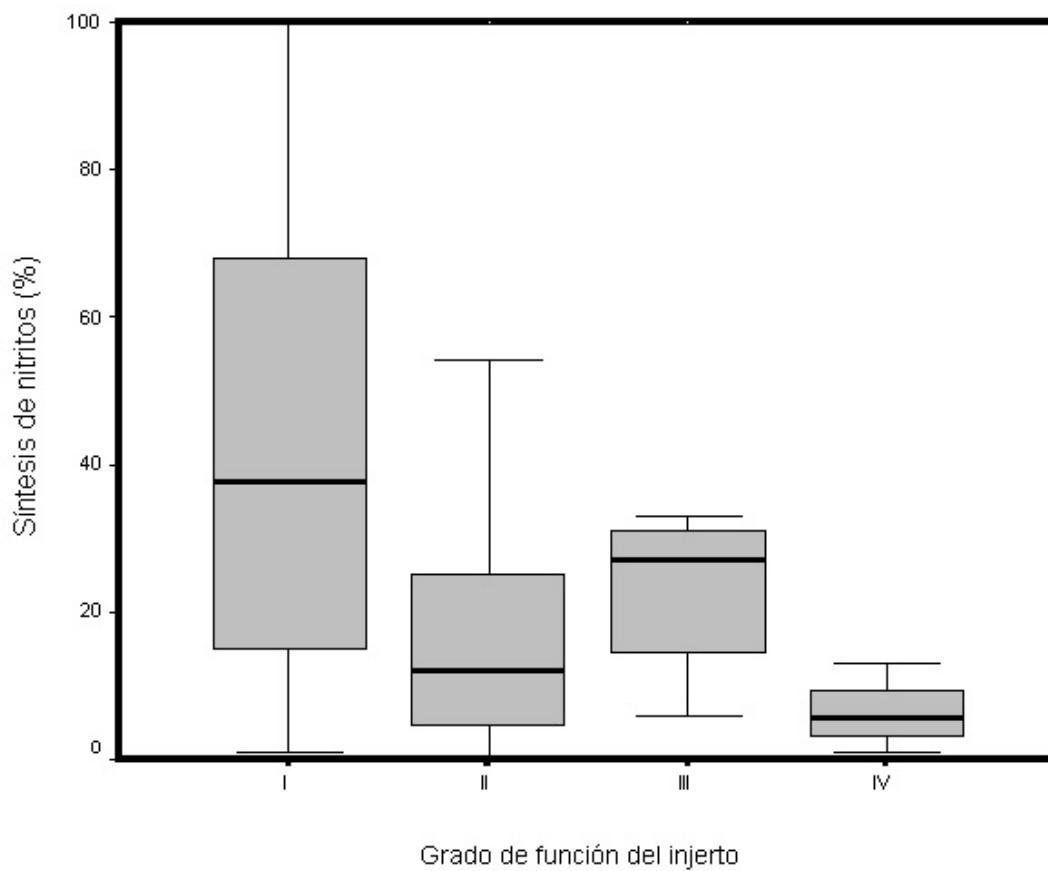


Figura 19.- Relación entre el grado de función hepática y NoA. Datos expresados como mediana, percentiles 25 y 75 y rango.

DISCUSIÓN

IV.- DISCUSIÓN

En este trabajo hemos observado que durante la isquemia del injerto en el TH en humanos, se acumulan sustancias capaces de inhibir la actividad de la NOS. Mediante HPLC y espectrometría de masas se ha comprobado la presencia de concentraciones elevadas de ADMA y en algunos casos de MMA en el lavado del hígado, tras la isquemia. Por otra parte hemos demostrado que la isquemia fría prolongada es suficiente para que se produzca ADMA en cultivos de hepatocitos. En nuestros resultados, paradójicamente, se asocia una baja capacidad del lavado del injerto de inhibir la iNOS con una mayor incidencia de SPR. Además encontramos relación entre la función precoz del hígado tras su trasplante y la capacidad de inhibición de la iNOS del lavado del injerto.

Relación entre las alteraciones de la vía de síntesis del NO y el TH

Las referencias bibliográficas apuntan a una relación entre la vía de síntesis del NO y los resultados obtenidos en los trasplantes en cuanto a la viabilidad del injerto e incluso sobre la supervivencia de los receptores en animales.

Además la posible influencia de la síntesis del NO en el injerto sobre la situación de vasodilatación en la reperfusión es obvia.

NOS en el injerto

Se ha descrito en hepatectomías parciales en humanos que la isquemia por la maniobra de Pringle (oclusión temporal de la porta y la arteria hepática) induce la iNOS y aumenta la producción de nitritos medidos en las venas suprahepáticas (Sugawara y cols., 1998). En conejos anestesiados se ha comprobado que la isquemia caliente produce un rápido aumento de la concentración intrahepática de NO (Lhuillier y cols., 2003). Por lo tanto la isquemia caliente puede inducir la producción de NO. Sin embargo en otros trabajos no se comprueba esa inducción por la isquemia (Smith y cols., 1997). Las condiciones del TH son diferentes de las citadas, ya que se trata de un hígado al que se le extrae la sangre por lavado, se mantiene bañado en la solución de preservación y además se le somete a isquemia fría prolongada (515 min de media en nuestra muestra). En esta situación hemos comprobado en 16 biopsias una completa ausencia de expresión de la iNOS inmediatamente antes de la reperfusión del injerto. Los glucocorticoides inhiben la transcripción de la iNOS, por lo

que podrían explicar nuestros resultados. Sin embargo, hemos comprobado que no se administraron corticoides a ninguno de los donantes de nuestra serie, de manera que no se encontraban en el injerto. En el paciente receptor sólo se estaban administrando antes de la reperusión en uno de los casos de retrasplante.

Medida del NO en el injerto

Una vez comprobado que no se expresaba la iNOS en el injerto sería muy difícil que la eNOS fuese capaz de producir NO en cantidades significativas, pero de todas formas analizamos los metabolitos del NO (nitritos/nitratos) en 6 casos. En ninguno se produjo una acumulación de estas sustancias en el injerto durante la isquemia. Este resultado coincide con los trabajos de Längle, en los que dichos metabolitos disminuyen o se mantienen en sangre periférica respecto a los medidos antes de la reperusión (Längle y cols., 1994; 1995; Roth y cols., 1994). Esteban y cols. (1995) comunicaron en un congreso que el NO_2^- y el NO_3^- aumentan significativamente en los pacientes en los que el hígado sufre una lesión grave por isquemia (aunque no se especifican los criterios diagnósticos de esa lesión), pero sólo 60 min. tras la reperusión. Otro trabajo realizado en

13 TH en humanos describe la medida de nitritos y nitratos en plasma sin encontrar variaciones durante el trasplante. Sin embargo en este mismo trabajo, al medir por espectroscopia de resonancia paramagnética de electrones (EPR), los aductos de nitrosil-hemoglobina 5 y 60 min tras la reperfusión, comprobaron que se producía un aumento significativo tras la reperfusión (Battista y cols., 2002). Ambas medidas tienen el inconveniente de que se realizan en sangre periférica, de manera que en sus variaciones no sólo interviene el injerto hepático.

Más recientemente se han estudiado 15 pacientes sometidos a TH con resultado parecido: no aumenta la producción de NO hasta el segundo día tras el TH y permanece así hasta 15 días después (Zanaro y cols., 2001).

Efecto de las muestras sobre la actividad de la NOS

A pesar de comprobar que no hay una inducción de la NOS ni un aumento de la síntesis del NO durante la isquemia en el injerto, podría ocurrir que se encontrasen sustancias moduladoras de la NOS en el mismo.

Hemos empleado dos modelos experimentales para comprobar el efecto del suero de los pacientes sobre la actividad de la

NOS, tanto la inducible como la endotelial. Ambos son modelos bien conocidos y nuestro grupo ha trabajado ampliamente con ellos.

Efectos sobre la actividad de la iNOS

El modelo de cultivo de macrófagos estimulados con LPS nos ha servido para comprobar el efecto de las diferentes muestras sobre la iNOS. Durante la IR se acumulan en el injerto sustancias inhibitoras que consiguen disminuir la producción de NO en los cultivos. Además deducimos que son potentes y/o están muy concentradas, porque incluso diluyendo la muestra A al 10% conseguimos anular la actividad de la iNOS de los cultivos. Por otra parte la actividad de inhibición todavía es detectable y significativa (respecto a R-10) en la sangre periférica hasta por lo menos 60 min. tras la reperusión.

En los cultivos observamos que la actividad de la iNOS se recupera tras el lavado del cultivo, lo que confirma la reversibilidad del efecto obtenido con la muestra A.

Tras estudiar 7 muestras y comprobar que la mayor dilución con la que conseguíamos la potencia máxima de

inhibición era del 10% (vol/vol), empleamos esa dilución para todas las pruebas. Este método puede introducir un pequeño factor de error. En 7 casos la producción de NO en el cultivo de macrófagos al añadir la muestra A fue del 100% respecto al control, es decir que no objetivamos una inhibición de la iNOS. Posiblemente con una menor dilución hubiéramos comprobado algo de capacidad de inhibición. El posible error por la situación opuesta es aún menor al tratarse sólo de 1 caso con 0% de producción de NO, es decir una capacidad de inhibición del 100%.

Para comprobar los resultados obtenidos por la medida de los metabolitos del NO en los cultivos, repetimos los experimentos determinando la actividad de la iNOS por la medida de la producción de citrulina a partir de arginina marcada. Los resultados confirman la disminución reversible de la actividad de la iNOS en presencia de la muestra A.

*Efecto sobre la expresión de la iNOS en cultivos
de macrófagos*

La disminución de la actividad de la iNOS en los cultivos en presencia de la muestra A podría deberse a una inhibición de la expresión del enzima. En el estudio del ARN

específico comprobamos que el LPS aumenta la expresión, que la muestra R-10 no tiene ningún efecto y que, en cambio, la combinación de LPS+A (al 10%) produce un aumento significativo de la expresión del enzima. Este efecto apoya la posible inhibición de la iNOS de manera que la falta de producción de NO actúa sobrestimulando la síntesis del enzima.

Análisis de la actividad tipo arginasa en el lavado.

Medida de la arginina en los cultivos

Se comprobó que en el injerto se libera arginasa en cantidades variables durante la isquemia, como se había descrito en la literatura. Se han medido concentraciones de 2384 ± 1456 UI/L en sangre periférica inmediatamente tras la reperfusión hepática en humanos (Roth y cols., 1994). Nosotros encontramos 4632 ± 1211 UI/L de arginasa en el lavado A. Por este motivo podría disminuir la arginina en los cultivos con el lavado A y ser ésta la causa de la disminución de la síntesis de NO. Sin embargo este efecto persistió a pesar de aportar arginina en cantidades sobradamente suficientes al cultivo, de manera que la arginasa no es la causa principal de la disminución de NO en los cultivos.

Efecto de las muestras sobre la actividad de la eNOS

Para analizar una posible modulación de la eNOS por el contenido del injerto empleamos anillos de aorta de conejo contraídos con noradrenalina. Al añadir Ach al baño del anillo, ésta actúa sobre la eNOS dependiendo de su concentración e induce la relajación de la aorta. En los 20 casos estudiados comprobamos que el lavado del injerto disminuye significativamente tanto el efecto relajante máximo como el PD_2 de la relajación de la Ach. Este resultado indica que la muestra A, a diferencia de la R-10, inhibe la actividad de la NOS.

El hecho de que la relajación conseguida con Ach vuelve a ser normal después de cambiar el baño de los anillos de aorta demuestra que la inhibición de la eNOS, como la de la iNOS, es reversible.

El lavado A se diluyó al 10% en los baños. Como en el caso de los cultivos de macrófagos esto puede introducir un factor de error. En este caso es menor que en los cultivos porque sólo en un caso comprobamos un 0% de capacidad de inhibición y ningún caso llegó al 100% de inhibición.

- Identificación de los inhibidores de la NOS

Los principales inhibidores naturales producidos en mamíferos son los derivados metilados de la arginina, especialmente la MMA y la ADMA. Además del efecto de inhibición el NMMA (N(G)-monometil-L-arginina) también inhibe la captación de la arginina por la célula en macrófagos y en queratinocitos (DeGeorge y cols., 1997). Por ello buscamos estos derivados de la arginina en el lavado del injerto. Hemos comprobado que tras la isquemia se liberan ADMA y MMA en el hígado. Las concentraciones de ADMA encontradas en el lavado son muy altas. También tiene importancia la MMA, aunque se encontró en pocos casos y en concentraciones menores, porque su potencia como inhibidor de la NOS es mayor que la de la ADMA. La presencia de estas dos sustancias explica por sí misma el grado de inhibición de la NOS demostrado *in vitro*. Se ha comprobado que la ADMA produce un aumento significativo de la concentración umbral de Ach necesaria para relajar anillos de aorta precontractados *in vitro* (Jin y cols., 1996). El efecto de estas dos metilargininas podría potenciarse por la presencia de la arginasa. También hemos encontrado SDMA, sustancia que no inhibe la iNOS como la ADMA y la MMA, aunque puede competir por el transporte de la arginina (Nijveldt RJ y cols., 2003).

En general el origen de estas sustancias se deriva de la proteólisis, liberándose arginina previamente metilada mediante un proceso bien conocido (Aletta y cols., 1998; Chen y cols., 1999). Se han identificado varias arginina-proteína metiltransferasas en tejidos de mamíferos relacionadas con diferentes procesos como el desarrollo y la regulación de la transcripción (Leiper y cols., 1999; Lee y cols., 2002, Branscombe y cols., 2001; Pawlak y cols., 2000). En el injerto las metilargininas se acumulan, cosa que no ocurre *in vivo* porque se eliminan por vía urinaria o se metabolizan formando citrulina y dimetilamina o monometilamina (Nijveldt y cols., 2003).

Una posible vía alternativa para la formación de metilargininas sería la metilación de arginina libre. Ésto parece menos probable porque en cultivos de hepatocitos no sólo se mantiene, sino que incluso aumenta la formación de metilargininas en ausencia de arginina libre. Por lo tanto, si la producción de derivados metilados de la ARG depende de proteólisis, es lógico asumir que los injertos dañados en el donante, durante la isquemia, o en la reperfusión, deben sufrir una mayor proteólisis y por lo tanto liberar más inhibidor y viceversa. En trabajos experimentales en ratas midiendo proteasas específicas de la arginina tras un TH, se

ha comprobado que existe una correlación positiva entre las proteasas y la hepatocitolisis (medida por la AST en plasma) e incluso con la supervivencia del injerto. Además, la inhibición de las proteasas con cloruro de gadolinio y glicina disminuyó la actividad de las proteasas y aumentó la supervivencia del injerto (Schemmer y cols., 2000).

Limitaciones del estudio

Hemos estudiado 77 trasplantes hepáticos realizados en pacientes adultos, no consecutivos y seleccionados especialmente para aumentar el número de casos con mala función. Como se trata de un estudio observacional en el que se realiza el trasplante con la técnica y medicación habituales, el resultado debe poderse extrapolar a la población general excepto en lo que atañe a los criterios de selección. Evidentemente la incidencia de función regular o mala es más alta en la muestra elegida que en nuestros resultados generales.

Número de pacientes: El diseño inicial del estudio preveía aumentar la muestra de casos de función IV para confirmar los resultados. Decidimos detener el estudio cuando encontramos relación entre la función del injerto y el grado

de inhibición y sobre todo porque identificamos dos inhibidores de la NOS. Será más interesante continuar este trabajo analizando directamente la concentración de los inhibidores en el injerto en lugar de medir el grado de inhibición por el efecto del lavado sobre preparaciones *in vitro*.

Muestras recogidas. Para estudiar el contenido del injerto tras la IR, empleamos los 200 cc iniciales que extraemos del mismo, repartidos en 4 jeringas de 50 cc. La capacidad de inhibición sobre la iNOS es importante en las 4 muestras (Fig cultivo 1a), pero mayor en la primera (A). Por ello empleamos en todos los pacientes la medida de la inhibición conseguida con esa muestra A. Hay que tener en cuenta que aunque extraemos siempre los primeros 50 cc para tomar esa muestra, el contenido de volumen del injerto y el flujo portal son variables. Por ello en algún injerto el contenido puede haberse diluído más (disminuir la capacidad de inhibición) por contener menos volumen y/o por entrar más flujo portal. La situación inversa es igualmente posible: el flujo portal inicial puede ser escaso respecto al contenido hepático y por lo tanto obtendremos una muestra A con mayor concentración de inhibidor.

Otro punto importante es que con el lavado eliminamos evidentemente gran parte del contenido del injerto, de manera que la repercusión del mismo sobre el organismo tras la reperfusión disminuye. Aún así comprobamos que las muestras R10 y R60, extraídas de sangre arterial periférica del paciente (tras la dilución del contenido del injerto en la volemia del paciente) mantienen una capacidad de inhibición de la iNOS significativamente mayor que la de R-10.

Relación entre los datos clínicos del TH y la producción de nitritos en cultivos con la muestra A (NoA)

Podría ocurrir que el origen del inhibidor estuviera en el donante antes de extraer el hígado. Estudiando los resultados de los años 91 al 2000, la ONT ha establecido que los hígados de donantes con una edad superior a 44 años tienen una supervivencia menor. Sin embargo, no encontramos relación entre la edad del donante y el NoA. Es posible que con una muestra mayor o con mayor número de donantes de mayor edad, se hubiese demostrado una influencia de esta variable.

La necesidad de emplear vasoconstrictores en el donante, que pueden disminuir el flujo de sangre en la vena porta y deteriorar la función del injerto, tampoco influyó en la NoA.

Hay que tener en cuenta que hemos excluido del estudio los casos con esteatosis, en los que cabe la posibilidad de que el grado de inhibición sea distinto en esa situación.

Sí encontramos relación estadística entre el tiempo de isquemia y el grado de inhibición de la iNOS, de manera que ambas aumentan correlativamente aunque con un r bajo, lo que indica que en este proceso intervienen más variables. La Organización Nacional de Trasplantes ha establecido, estudiando los resultados de los años 91 al 2000, que los injertos que sufren un tiempo de isquemia inferior a las 6 horas tienen una supervivencia significativamente mayor que el resto (Datos de la ONT: 4^a Memoria 1984-2000). Por ello estudiamos también la relación entre el grado de inhibición de la iNOS y dicho tiempo de isquemia.

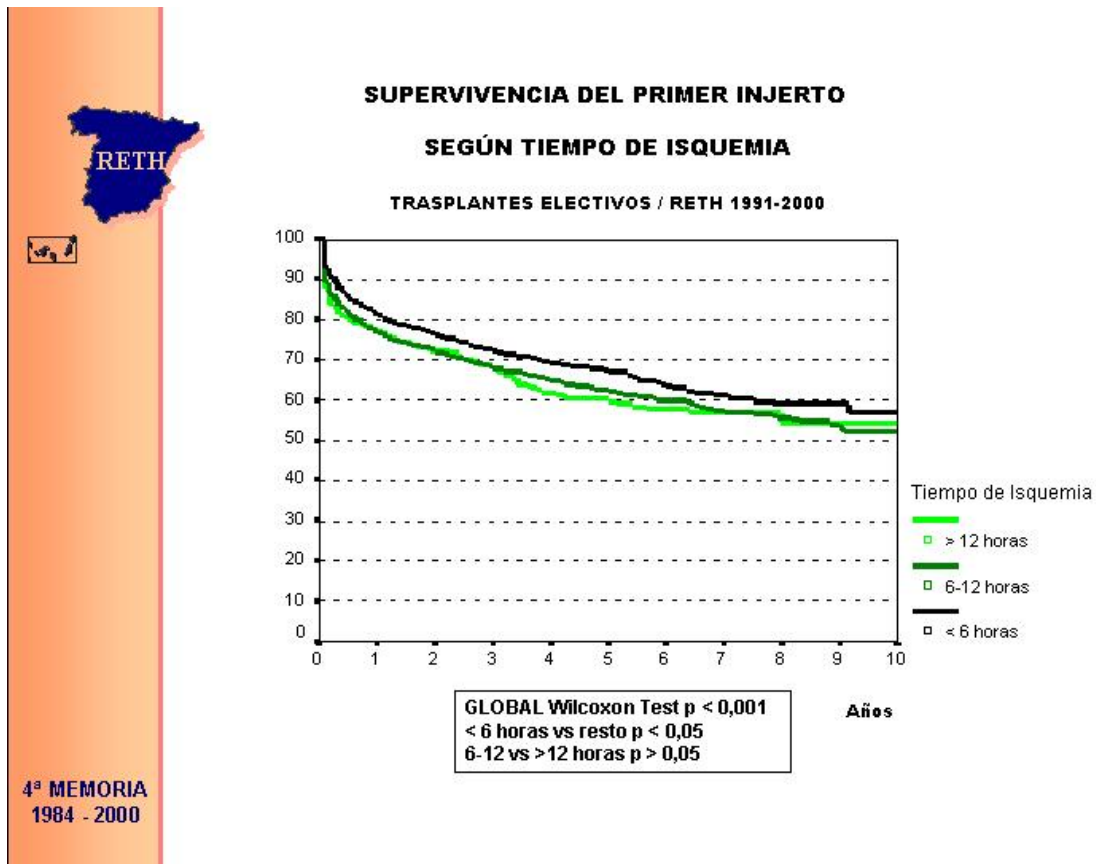


Figura 20.- Relación entre la supervivencia del injerto y el tiempo de isquemia. Datos de la ONT, (www.msc.es/ont/esp/registro/f_registro.htm)

Los 7 pacientes de nuestra serie trasplantados con menos de 6 horas de isquemia presentaron una función de grado I. En estos casos el grado de inhibición resultó significativamente menor. Con estos resultados cabe pensar que el grado de función del injerto viene determinado por el tiempo de isquemia y que éste a su vez establece la mayor o menor producción del inhibidor de la NOS en el injerto. Sin embargo

en nuestra serie el tiempo de isquemia no se relaciona significativamente con el grado de función. De los 6 pacientes que se trasplantaron tras un tiempo de isquemia superior a 12 h, 4 mostraron una función excelente (grado I), uno función III y el restante, función IV.

Relación entre el grado de inhibición de la NOS y los datos preoperatorios del receptor

Podría ocurrir que la capacidad de inhibir la NOS en el TH se originase en el paciente receptor y la detectásemos en el lavado del injerto debido al lavado con sangre portal. En este caso dependería más de las características de los pacientes receptores o de las circunstancias de la cirugía que del propio injerto. Los pacientes cirróticos a menudo desarrollan hipertensión portal y una circulación hiperdinámica caracterizada por hipotensión sistémica debida una vasodilatación intensa a pesar de tener un gasto cardíaco aumentado (Michielson y Pelckmans, 1994). Se ha sugerido que estos cambios se deben a un exceso en la producción de NO que sería la causa de la vasodilatación (Vallance y Moncada, 1991). La causa de la estimulación de la NOS podrían ser el aumento de endotoxinas que pasan a la circulación por el deterioro hepático (Guarner y cols., 1993). Las citoquinas

también estimulan la NOS y se ha comprobado que el factor de necrosis tumoral α y la interleukina- 1β también están elevadas en pacientes con hepatopatías crónicas y especialmente en los sujetos cirróticos (Tilg y cols., 1992). Finalmente se ha comprobado que la actividad de la NOS en los neutrófilos de pacientes con lesión hepática se encuentra aumentada proporcionalmente al grado de disfunción (valorado por la clasificación de Child-Pugh) y que, además, el grado de hipotensión también se correlaciona con el aumento de la actividad de la NOS (Galley y cols., 1998). Todos estos trabajos demuestran una potenciación de la vía de la NOS en la hepatopatía. Sin embargo podría ocurrir que durante el clampaje de porta cambiase esta situación y se produjeran alteraciones específicas que llevasen a la producción de inhibidores de la NOS en el mesenterio. Como los pacientes cirróticos en general sufren hipertensión portal y desarrollan abundantes derivaciones vasculares para permitir el drenaje evitando el paso por el hígado, deberíamos obtener algo de inhibición con la muestra R-10. Además, en nuestra casuística no hay relación estadística entre el NoA y ninguna de las características recogidas del receptor (edad, sexo, diagnóstico, grado Child-Pugh en las cirrosis). Finalmente, en 8 casos lavamos el injerto con suero en lugar de con sangre y comprobamos que la inhibición se sigue produciendo.

Por ello descartamos que el inhibidor se origine en el mesenterio del paciente receptor o que sea el resultado de la interacción de la sangre portal con el injerto. De los datos obtenidos hasta ahora podemos deducir que las circunstancias del paciente receptor no influyen en el grado de inhibición.

Relación entre la NoA y el SPR

La hipotensión que se puede producir inmediatamente tras la reperfusión del injerto es una entidad descrita desde hace años, pero su causa todavía no se conoce (Aggarwall y cols., 1993). Sin embargo la característica principal de la reperfusión es la situación de vasodilatación intensa y brusca (Webster y cols., 1994). Por ello nuestra hipótesis de trabajo fue que el sistema del NO podría estar implicado.

La vasodilatación de la reperfusión no tiene habitualmente una gran repercusión clínica, porque se compensa con un aumento del gasto cardíaco, de manera que incluso llegando a cumplir criterios de SPR puede pasar desapercibida. En nuestro grupo prestamos especial atención y sin embargo es frecuente que sólo se diagnostique el SPR al revisar el registro de PAM. Sin embargo es interesante la situación fisiopatológica en ese momento y se ha estudiado

buscando una posible relación con factores conocidos como el aumento de potasio, la disminución de la temperatura y la acidosis mixta causadas por el paso de resto de líquido de preservación a la circulación general. Se ha investigado la producción de diversas sustancias en el injerto durante la IR: prostaciclina y tromboxano (Aggarwall y cols., 1989b), endotoxinas (Blanot y cols., 1995), factor de necrosis tumoral (Acosta y cols., 1994), péptido intestinal vasoactivo (McNicol y cols., 1993), factor natriurético humano (Piccini y cols., 1995), sustancias antioxidantes (Goode y cols., 1994, El-Din y cols., 1995). Aunque muchas de ellas varían durante la reperfusión, no ha podido establecerse una clara relación con el SPR.

La situación de vasodilatación que se produce tras la reperfusión se ha relacionado con la liberación de diversas sustancias del injerto (Aggarwall y cols., 1987; 1993). En algunos trabajos se han analizado las alteraciones de la vía del NO en el TH. Sin embargo no se ha intentado relacionar dichas alteraciones con el SPR. Sí se ha sugerido una posible relación entre el déficit de arginina (precursor del NO) originado por la producción de arginasa y el aumento de las presiones pulmonares que ocurre frecuentemente en la reperfusión (Längle y cols., 1994; 1995; Roth y cols., 1994).

En nuestra serie aumentaron las presiones pulmonares en la reperfusión pero sin relación con el grado de inhibición de la iNOS conseguido con el lavado A, probablemente porque dependen más de las variaciones de la precarga y del gasto cardíaco.

Comenzamos estudiando en el injerto el sistema del NO para comprobar si se relaciona con el SPR. Para que se produzca hipotensión por vasodilatación por NO, debería estar inducida la iNOS antes de ese momento. En cuanto a la eNOS, difícilmente podría producir NO en cantidad suficiente para inducir una caída de las resistencias como la que se produce en nuestra casuística.

Basándonos en nuestros resultados el NO no puede ser la causa directa del SPR, ya que no detectamos derivados del NO en grandes cantidades y además comprobamos que no está inducida la iNOS en el injerto. Sin embargo las variaciones en el grado de inhibición de la NOS encontradas en el injerto podrían relacionarse con el grado de vasodilatación desencadenado tras la reperfusión y por lo tanto con el grado de hipotensión. Para valorar la disminución de la PAM tras la reperfusión empleamos dos datos: la cifra mínima de PAM en los primeros 5 min. y el SPR60. Los inhibidores de la NOS

producen un aumento de las resistencias vasculares y una disminución del gasto cardíaco en humanos (Lepori y cols., 1998; Owlya y cols., 1997) y estos hechos también se han comprobado en pacientes cirróticos (Saphr y cols., 2002). Este efecto vasoconstrictor se debe a la disminución de la actividad de la eNOS y parcialmente a la activación del sistema nervioso simpático (Chowdhary y Townend, 1999). Por ello si pasaran en cantidad suficiente a la circulación esperaríamos encontrar más hipotensión en los casos con poco inhibidor. Sorprendentemente el resultado es el contrario; los casos con mayor potencia de inhibición en el lavado tienen una mayor incidencia de hipotensión valorada como la mínima PAM y como el SPR60. Esta paradoja se explica parcialmente porque medimos la inhibición en los primeros 50 cc del lavado del injerto (muestra A); todavía se extraen 150 cc más y después lo que pueda quedar en el injerto pasa a la circulación pero diluído en el total de la volemia, por lo que el efecto se atenúa. Sin embargo en R10 e incluso en R60 persiste la actividad de inhibición detectable en sangre arterial periférica del receptor. Por ello la causa de la hipotensión en la reperusión no es la liberación directa de NO y tampoco una menor presencia de inhibidores de la NOS. Probablemente la liberación de los mediadores que ocasionan la hipotensión se asocia a la liberación de los inhibidores

de la NOS y por eso encontramos una asociación estadística entre estos dos últimos datos.

Función precoz del injerto

Muchos trabajos relacionan las alteraciones de la vía del NO con la función precoz del injerto. En general las medidas que aumentan el NO mejoran la viabilidad del trasplante e incluso disminuyen la mortalidad de animales trasplantados, aunque hay estudios discrepantes (Koeppel y cols., 1997).

Lo más importante de este trabajo, por su posible trascendencia clínica, es el estudio de la relación entre la función del injerto y la presencia de inhibidores de la NOS en él. Para determinar la función se han descrito multitud de datos clínicos, bioquímicos y de anatomía patológica. En nuestro hospital se determina la función por los criterios de la escala de Toronto (Greig y cols., 1989) y no siempre se extraen biopsias tras el trasplante, por lo que hemos basado el trabajo en esta escala. En ella obtenemos datos del grado de citólisis por la liberación al plasma de AST, de la función de síntesis hepática por el tiempo de protrombina y de la capacidad de eliminación de sustancias por la

producción y calidad de la bilis. Podría ocurrir que el grado de inhibición de la NOS estuviese relacionado especialmente con uno de estos tres datos. En el análisis estadístico no encontramos asociaciones que apunten en esta dirección. Sin embargo sí hay una relación significativa entre la NoA y la función determinada por la combinación de los datos de citólisis, síntesis y eliminación de bilis. Es muy sugerente la estrecha agrupación (con inhibición superior al 90%) de los 4 casos de muy mala función (grado IV). No es una relación perfecta porque el grado de inhibición de la iNOS es mayor en el grado III que en el grado II. Además la dispersión de grados de inhibición en la función I recorre todo el rango posible: desde 0 de producción de NO en los cultivos de macrófagos (inhibición completa) hasta 100% de producción (inhibición nula). Estos datos sugieren que intervienen otras variables que podrían determinar la dispersión en la NoA. Para intentar identificar estas asociaciones realizamos un análisis jerárquico en busca de grupos de casos identificados por datos similares. Encontramos un grupo de 11 pacientes caracterizado por un tiempo de isquemia corto (en torno a 6 horas), muy baja capacidad de inhibición de la iNOS (alrededor del 10%) y un 81% de función I. Si se confirma esta asociación se podría prever una alta incidencia de función excelente cuando el

tiempo de isquemia fuese corto y en el lavado del injerto se comprobase poca capacidad de inhibición de la NOS.

No se ha descrito en la literatura la producción de inhibidores de la NOS en los injerto hepáticos, pero sí hay datos de la manipulación de la vía de la síntesis del NO y su influencia sobre la función del injerto hepático.

Entre los mecanismos de acción del NO por los que podría atenuar la lesión IR se puede considerar su efecto vasodilatador, por ser inhibidor de la adhesión de polimorfonucleares al endotelio o por atrapamiento de radicales libres. Sin embargo también podría aumentar la lesión por formación de peroxinitritos, inhibición de la respiración mitocondrial o por nitrosilación de enzimas de la síntesis del DNA. Posiblemente su efecto neto depende de la cantidad total de NO formado y de otras circunstancias que actúen simultáneamente. De todas formas la descripción de que la presencia de un inhibidor de la NOS se asocie a una peor función del injerto concuerda con los conocimientos actuales. Una parte importante de la lesión de reperfusión se debe al deterioro de la microcirculación en el injerto facilitando el depósito y la activación de polimorfonucleares y de las células de Kupffer. En estas circunstancias, los factores que

empeoren la circulación, como sería el caso de un inhibidor de la NOS, probablemente deterioren la función. La literatura sobre este tema, como se expuso ampliamente en la introducción, apunta en esta dirección. La potenciación de la síntesis con L-ARG o la administración de donantes de NO reducen la lesión IR incluso mejorando la supervivencia de los animales de experimentación. Además la administración de inhibidores de la NOS en general deteriora la viabilidad de los injertos.

CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

1° En nuestras condiciones de mantenimiento de los injertos a trasplantar no se activa el sistema del NO, ya que ni se ha observado una expresión de la iNOS, ni tampoco se incrementaron las concentraciones de nitritos/nitratos en el líquido de preservación. Ello descarta que la vasodilatación observada inmediatamente tras la reperusión sea debida a la liberación de NO desde el injerto.

2° En el lavado del injerto hemos encontrado factores solubles que, en grado variable, producen una inhibición reversible tanto de la iNOS como de la eNOS.

3° La inhibición en estas muestras desaparece cuando se extraen la arginina y sus derivados metilados mediante el paso por una columna Dowex. El análisis mediante HPLC del eluato de dichas columnas mostró que contenía tres sustancias con tiempos de retención iguales a los correspondientes a los estándares de MMA, ADMA y SDMA. El estudio por espectrometría de masas de los picos referidos, permitió su identificación química como MMA, ADMA y SDMA.

4° El grado de inhibición de la NOS que producen diferentes concentraciones de los estándares de las metilargininas concuerda con el grado de inhibición conseguido con las concentraciones medidas en los líquidos de lavado del injerto.

5° Las metilargininas encontradas en el líquido de lavado se originan en el injerto.

6° La formación de las metilargininas en el líquido de lavado del injerto es función del tiempo de isquemia, ya que existe una correlación positiva entre ambos.

7° Existe una asociación entre la inhibición de NOS por el líquido de lavado del injerto y la frecuencia de aparición del síndrome postreperfusión.

8° En nuestras condiciones de trabajo, existe una relación entre la función precoz del hígado trasplantado y el grado de inhibición de la iNOS por el líquido de lavado del injerto. Ello abre nuevos campos de investigación acerca de la posible utilización de las medidas de concentración de metilargininas como predictores de la evolución del TH, así

como de los efectos que la manipulación farmacológica de éstos pueda producir sobre dicha evolución.

BIBLIOGRAFÍA

VI.- BIBLIOGRAFÍA

Acosta F, Lizán L, Fuente T, Benito M, Cura S, Belmonte J. Perioperative productions of tumor necrosis factor in orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1994; 5: 113-5.

Acosta F. Cardiologic evaluation of the candidate for liver transplantation. *Transplantation* 1996; 7: 20-21.

Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, Castaing D, Bismuth H. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 1538-40.

Aggarwall S, Kang Y, Freeman JA, Fortunato FL, Pinsky MR. Postreperfusion syndrome: cardiovascular collapse following hepatic reperfusion during liver transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19: 54-55.

Aggarwal S, Kang Y, Freeman J, De Wolf AM, Begliomini B. Is there a postreperfusion syndrome? *Transplant Proc* 1989a; 21: 3497-3499.

Aggarwal S, Evans R, Kang YG, Freeman J, Begliomini B, Fortunato FL. The role of prostacyclin and tromboxane on reperfusion hypotension during liver transplantation. *Anesthesiology* 1989b; 71(3A):72.

Aggarwal S, Kang YG, Freeman JA, Fortunato FL, Pinky M. Postreperfusion syndrome: hypotension after reperfusion of the transplanted liver. *J Crit Care* 1993; 8: 154-60.

Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ. Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 89-91.

Arai M, Mochida S, Ohno A, Fujiwara K. Blood coagulation in the hepatic sinusoids as a contributing factor in liver injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1996; 62: 1398-401.

Arroyo V, Gines P. Arteriolar vasodilation and the pathogenesis of the hiperdynamic circulation and renal sodium and water retention in cirrhosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 1077-1080.

Battista S, Mengozzi G, Bar F, Cerutti E, Pollet C, Torchio M, Biasi F, Cavalli G, Salizzoni M, Poli G, Molino G. Nitric oxide level profile in human liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 528-34.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshal PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-4.

Bell FP, Essani NA, Manning AM, Jaeschke H. Ischemia-reperfusion activates the nuclear transcription factor NF- κ B and upregulates messenger RNA synthesis of adhesion molecules in the liver in vivo. *Hepatology* 1997; 8: 178-88.

Blanot S, Gillon MC, Lopez I, Ecoffey C. Circulating endotoxins and postreperfusion syndrome during orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60: 103-6.

Bogle R, MacAllister RJ, Whitley GSJ, Vallance P. Induction of NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) uptake: a mechanism for differential regulation of NO synthases? *Am J Physiol* 1995; 269: C750-6.

Borghesi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, Henin D, Degott C. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transplant Surg* 1997; 3: 407-15.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1975; 72: 248-54.

Branscombe TL, Frankel A, Lee JH, Cook JR, Yang Z, Pestka S, Clarke S. PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J Biol Chem* 2001; 276: 32971-6.

Brems JJ, Takiff H, McHutchinson J, Collins D, Biermann LA, Pockros P. Systemic versus nonsystemic reperfusion of the transplanted liver. *Transplantation* 1993; 55: 527-9.

Buchwalow IB, Schulze W, Kostic MM, Wallukat G, Morwinski R. Intracellular localization of inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes in culture. *Acta Histochem* 1997; 99: 231-240.

Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of L-arginine after liver ischemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 1997; 183: 477-85.

Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 1989; 10: 292-9.

Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991; 13: 83-95.

Calleja J, Clemente G, Pérez Ferreiroa J, Bañares R, Polo J, García J, Valdecantos E, Olmedilla L, Santos L, Pérez Peña J, Fernández L, Alvarez E, Bouza E, Echenagusia A, Martín J. Programa de trasplante hepático del Hospital General Universitario Gregorio Marañón: análisis de los primeros 100 pacientes. *Revista Clínica Española* 1995; 195(4):207-13.

Camprubí I, Sabaté A, Mainer A, Dalmau A, Torras J, Figueras J. Percutaneous venovenous bypass in liver transplantation. Preliminary results. *Liver Transpl Surg* 1995; 1: 415.

Carles J, Fawaz R, Hamoudi NE, Neaud V, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Preservation of human liver grafts in UW solution. Ultrastructural evidence for endothelial and Kupffer cell activation during cold ischemia and after ischemia-reperfusion. *Liver* 1994; 14: 50-6.

Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 1999; 284: 2174-7.

Chowdhary S, Townend JN. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Clinical Science* 1999; 97: 5-17.

Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996; 23: 506-14.

Colombo JP, Komarska L. Arginase. En: Bergmayer HG, ed. *Methods of enzymatic analysis*, vol 4. Weinheim, Alemania: Verlag Chemie, 1984.

Cottart CH, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999 29: 809-13.

Couet J, Li S, Okamoto T, Scherer PE, Lisanti MP. Molecular and cellular biology of caveolae. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 4: 103-10.

Crawford DH, Halliday JW, Cooksley WG, Murphy TL, Golding SD, Wallace JD, Cuneo RC, Lynch SV, Strong RJ, Powell LW. Distribution of body water in patients with cirrhosis: the effect of liver transplantation. *Hepatology* 1993; 17: 1016-21.

Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ, Strasberg SM. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993; 18: 635-47.

D'Allessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffman RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, Hafez GR, Lorentzen D, Belzer FO. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 23: 1536-7.

DeGeorge GL, Heck DE, Laskin JD. Arginine metabolism in keratinocytes and macrophages during nitric oxide biosynthesis: multiple modes of action of nitric oxide synthase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 103-12.

Demetris AJ, Lasky S, Van Thiel DH, Starzl TE, Whiteside T. Pathology of hepatic transplantation. A review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine/steroid regimen. *Am J Pathol* 1985; 118: 151-61.

De Wolf AM. Does ventricular dysfunction occur during liver transplantation? *Transplant Proc* 1991; 23: 1922-3.

Diaz-Guerra MJ, Velasco M, Martin-Sanz P, Bosca L. Evidence for common mechanisms in the transcriptional control of type II nitric oxide synthase in isolated hepatocytes. Requirement of NF- κ B activation after stimulation with bacterial cell wall products and phorbol esters. *J Biol Chem* 1996; 271: 30114-20.

Díaz J, Acosta F, Parrilla P, Sansano T, Tornel PL, Robles R, Ramírez P, Bueno FS. Serum ionized magnesium monitoring during orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 835-7.

Donica S, Saunders C, Paulsen A, Hellman C, Gawey B, Ramsay M. Effects of potassium and temperature changes on hemodynamics at reperfusion during orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg* 1993; 76: 586.

El-Din HH, Bellamy MC, Goode HF, Webster NR. The effects of antioxidants on hemodynamics and coagulation following reperfusion in orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995; 1: 418.

Ellis JE, Lichtor JL, Feinstein SB, Chung MR, Polk SL, Broelsch C, Emond J, Thistlethwaite JR, Roizen MF. Right heart dysfunction, pulmonary embolism, and paradoxical embolization during liver transplantation. A transesophageal two dimensional echocardiographic study. *Anesth Analg* 1989; 68: 777-82.

Esteban F, Gomez-Jimenez J, Martin MC, Ruiz JC, Nuvials X, Garcia-Allut JL, Sauri R, Murio JE, Mourelle M, Segura RM, Mora A, Peracaula R, Margarit C, Salgado A. Nitric oxide and hepatic ischemic injury in human orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1995 Aug;27(4):2283-2285.

Estrin JA, Belani KG, Ascher NL, Lura D, Payne W, Najarian JS. Hemodynamic changes on clamping and unclamping of major vessels during liver transplantation. *Transplant Proc* 1989; 21: 3500-5.

Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury of the liver. *J Mol Med* 1999; 77: 577-92.

Forster J, Greig PD, Glynn MF, Poon A, Levy G, Superina RA, Langer B. Coagulation factors as indicators of early graft function following liver transplantation. *Transplantation Proc* 1989a; 21: 2308-10.

Forster J, Strasberg SM; Levy GA. Pattern of AST following liver transplantation. *Hepatology* 1989b; 21: 2308-10.

Furchgott RF. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries to acetylcholine and some other nitrovasodilator. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2: 173-6.

Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor pens is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM. *Vasodilation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*. Ed Raven Press, New York; 1988: 401-14.

Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987; 90: 687-92.

Galen FX, Cottart CH, Souil E, Dinh-Xuan AT, Vaubourdolle, Nivet V, Clot JP. Role of nitric oxide synthase III and guanosine 3':5'-cyclic

monophosphate in the protection exerted by nitric oxide on hepatic ischemia-reperfusion injury. *C R Acad Sci III* 1999; 322: 871-7.

Galley HF, Coomansingh D, Webster NR y Brunt PW. Nitric oxide synthase activity is increased in relation to the severity of liver disfunction. *Clinical Science* 1998; 95: 355-9.

Garutti I, Olmedilla L, Pérez-Peña JM, Zaballos M, Sanz J, Vigil MD, Navia J. Response to clamping to the inferior vena cava as a factor for predicting postreperfusion syndrome during liver transplantation. *Anesth Analg* 1997; 84: 254-9.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-60.

Gode G. Arginine and arginase phosphate. En: Bergmayer HG ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 8. Weinheim. Alemania: Verlag Chemie, 1985.

Goode HF, Webster NR, Howdle PD, Leek JP, Lodge JP, Sadek SA, Walter BE. Reperfusion injury, antioxidants and hemodynamics during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994; 19: 354-9.

Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR, Blendis LM, Superina RA, Glynn MF, Langer MF, Langer B. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation* 1989; 48: 447-53.

Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 707-36.

Gryglewski RJ, Moncada S, Palmer RM. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1986a; 87: 685-94.

Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1986b; 320: 454-6.

Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balzano J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18: 1139-43.

Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7809-13.

Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994; 94: 2407-13.

Henderson JM. Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepato-Gastroenterol* 1999; 46(suppl 2): 1482-4.

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 87-94.

Higa T, Shiraishi M, Mamadi T, Taira K, Oshiro T, Nozato E, Nagahama M, Muto Y. Limitations of exogenous L-arginine in exerting a cytoprotective effect on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surg Today* 2000; 30: 352-9.

Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver disease : friend, foe, or just passerby ? *Ann N Y Acad Sci* 2002; 962: 275-95.

Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Díaz-Guerra MJM, Boscá L. Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995; 21: 776-86.

Hue L, Felíu JE, Hers HG. Control of gluconeogenesis and of the enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1978; 176: 791-7.

Hui A-M, Kawasaki S, Makuuchi M, Nakayama J, Ikegami T, Miyagawa S. Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology* 1995; 20: 1287-93.

Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-[kappa]B. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 917-22.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In Vanhoutte PM. *Vasodilation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*. Ed Raven Press, New York; 1988: 427-36.

Inglott FS, Mathie RT. Nitric oxide and hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1722-5.

Ioannidis I, Hellinger A, Dehmlow C, Rauen U, Erhard J, Eigler FW, De Groot. Evidence for increased nitric oxide production after liver transplantation in humans. *Transplantation* 1995; 59:1293-1297.

Isobe M, Katsuramaki T, Hirata K, Kimura H, Nagayama M, Matsuno T. Beneficial aspects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 1999; 6: 803-13.

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990; 4: 3355-9.

Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260: G355-62.

Jin JS, D'Alecy LG. Central and peripheral effects of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28: 439-46.

Jones SM, Thurman RG. L-Arginine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 1996; 24: 162-8.

Jugan E, Albadalejo P, Jayais P, Ecoffey C. The failure of venovenous bypass to prevent graft liver postreperfusion syndrome. *Transplantation* 1992; 54: 81-4.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.

Kobayashi H, Nonami T, Kurosawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A; Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; 59: 772-9.

Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997; 27: 163-9.

Koken T, Inal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clin Chem Acta* 1999; 288: 55-62.

Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 1994; 74: 376-82.

Längle F, Steininger E, Roth E, Winkler S, Függer R, Andel H, Mühlbacher F. L-Arginine deficiency and hemodynamic changes as a result of arginase efflux following orthotopic transplantation. Communication to 7th Meeting of the Liver Intensive Care Group of Europe. Groningen, Holanda 1994.

Längle F, Roth E, Steininger R, Winkler S, Mühlbacher. Arginase release following liver reperfusion: Evidence of hemodynamic action of arginase infusions. *Transplantation* 1995; 59: 542-9.

Lee YH, Koh SS, Zhang X, Cheng X, Stallcup MR. Synergy among nuclear receptor coactivators: Selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3621-32.

Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J* 1991; 5: 2029-34.

Leiper J y Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 542-8.

Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Bio Chem* 1991; 266: 23790-5.

Lepori M, Sartori C, Trueb L, Owlya R, Nicod P, Scherrer U. Haemodynamic and sympathetic effects of inhibition of nitric oxide

synthase by systemic infusion of N^G-monomethyl-L-arginine into humans are dose dependent. *J Hypertens* 1998; 16: 519-23.

Lhuillier F, Parmantier P, Goudable J, Crova P, Delafosse B, Annat G, Cespuoglio R, Viale JP. Hepatic ischemia is associated with an increase in liver parenchyma nitric oxide that is in part enzyme-independent. *Anesthesiology* 2003; 98: 373-8.

Li Y, Zhang W, Mantell LL, , Kazzaz JA, Fein AM, Horowitz S. Nuclear factor-[kappa]B is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. *J Biol Chem* 1997; 272: 20646-9.

Liu P, Xu B, Spokas E, Lai PS Wong PY. Role of endogenous nitric oxide in TNF-alpha and IL-1beta generation in hepatic ischemia-reperfusion. *Shock* 2000; 13: 217-23.

Lucey MR, Brown KA, Everson GT, Fung JJ, Gish R, Keeffe EB, Kneteman NM, Lake JR, Martin P, McDiarmid SV, Rakela J, Shiffman ML, So SK, Wiesner RH. Minimal Criteria for Placement of Adults on the Liver Transplant Waiting List: A report of a National Conference organized by the American Society of Transplant Physicians and the American Association for the Study of Liver Diseases. *Liver Transpl Surg* 1997; 3: 628-37.

Ma Z, Lee S. Cirrhotic cardiomyopathy: getting to the heart of the matter. *Hepatology* 1996; 24: 451-459.

MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int* 1994; 45: 737-42.

Makowka L, Gordon RD, Todo S, Ohkohchi N, Marsh JW, Tzakis AG, Yokoi H, Ligush J. Analysis of donor criteria for the prediction of outcome in clinical liver transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19: 2378-82.

Marquez JM, Martin J, Virji MA, Kang YG, Warty VS, Shaw B, Sassano JJ, Waterman P, Winter PM, Pinsky MR. Cardiovascular depression secondary to ionic hypocalcemia during hepatic transplantation in humans. *Anesthesiology* 1986; 65: 457-61.

Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent end glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 708-16.

Marzi I, Takei Y, Knee J, Menger M, Gorees GJ, Buhren V, Trentz O, Lemasters JJ, Thurman RG. Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1990; 22: 2004-5.

Marzi I, Takei Y, Rucker M, Kawano S, Fusamoto H, Walcher F, Kamada T. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transplant Int* 1994; 7: S503-6.

McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.

McNicol PL, Liu G, Shulkes A, Hardy KJ, Jones RM. Vasoactive intestinal peptide and calcitonin gene-related peptide levels and hemodynamics during human liver transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25: 1830-1.

Michel T, Xie QW, Nathan C. Molecular biological analysis of nitric oxide synthases. In: *Methods in Nitric oxide research*. M Feelisch and JS Stamler ed. John Wiley & Sons, UK. 1995: 161-75.

Michel T, Feron O. Perspective series: Nitric oxide and Nitric oxide synthases. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-52.

Michielson PP and Pelckmans PA. Haemodynamic changes in portal hypertension: new insights into the pathogenesis and clinical implications. *Acta Gastroenterol* 1994; 57: 194-205.

Millis JM, Melinek J, Csete M, Imagawa DK, Olthoff KM, Neelankanta G, Braunfeld MYC, Sopher MJ, Chan SM, Pregler JL, Yersiz H, Busuttil AA, Shackleton CR, Shaked A, Busuttil RW. Randomized controlled trial to evaluate flush and reperfusion techniques in liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 397-403.

Moncada S, Palmer RMJ, Gryglewski RJ. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9164-8.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.

Moncorgé C, Baudin F, Vigouroux C, Ozier Y, Ortega D, Lecam B, Garnier JF, Houssin D. Liver transplantation in adults: postoperative management and development during the first months. *Ann Fr Anesth Réanim* 1989; 8: 497-517.

Moshage H, Kok B, Huizengra JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-6.

Nagel RA, Dirix LY, Haylar KM, Preisig R, Tredger JM, Williams R. Use of quantitative liver function tests - caffeine clearance and galactose elimination capacity - after orthotopic liver transplantation. *J Hepatol* 1990; 10: 149-57.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-64.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915-8.

Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MP, Van Lambalgen AA, Rawerda JA, Van Leeuwen PA. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 2003; 22: 17-22.

Nilsson B, Delbro D, Wallin M, Friman S. Protective effect of nitric oxide and prostaglandin E(2) in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc* 2001; 33: 2518-20.

Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998; 66: 579-85.

Oishi A, Inagaki M, Sadamori H, Yagi T, Tanaka N. The effect of nitric oxide production by sinusoidal endothelial cells on preservation injury during cold ischemia. *Hepatology* 2001; 34: 325-35.

Owlya R, Vollenweider L, Trueb L, Sartori C, Lepori M, Nicod P, Scherrer U. Cardiovascular and sympathetic effects of nitric oxide inhibition at rest and during static exercise in humans. *Circulation* 1997; 96: 3897-903.

Ozakyol AH, Tuncel N, Saricam T, Uzuner K, Ak D, Gurer F. Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury. *Pathophysiology*. 2000; 7: 183-188.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.

Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 348-52.

Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. *J Biol Chem* 1994; 269: 1199-215.

Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4859-69.

Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Roselló-Catafau J, Gelpi E, Rodes J. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001; 71: 529-36.

Petros A, Lamb G, Leone A, Moncada S, Bennett D, Vallance P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 34-9.

Piccini P, Rossaro L, Graziotto A, Tripepi A, Meneghetti L, Inturri P. Human natriuretic factor in cirrhotic patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Transpl Int* 1995; 8: 51-4.

Ricciardi R, Foley DP, Quarfordt SH, Saavedra JE, Keefer LK, Wheeler SM, Donohue SE, Callery MP, Meyers WC. V-PYRRO/NO: an hepatoselective nitric oxide donor improves porcine liver hemodynamics and function after ischemia reperfusion. *Transplantation* 2001; 71: 193-8.

Roth E, Steininger R, Winkler S, Längle F, Grünberger T, Függer R, Mühlbacher F. L-Arginine deficiency after liver transplantation as an

effect of arginase efflux from the graft. *Transplantation* 1994; 57: 665-9.

Rubanyi GM, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am J Physiol* 1985; 249: H95-H101.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hiperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: H822-7.

Sabaté A, Figueras J, Segura R, Fuentelsanz T, Camprubí I, Jaurrieta E. Utilización de derivación veno-venosa en el trasplante ortotópico de hígado. *Rev Esp Anestesiología Reanimación* 1993; 40: 12-16.

Sabaté A, Figueras J, Drudis R, Camprubí I, Dalmau A, Bartolomé C, Jaurrieta E. Circulatory status and arterial-mixed venous gradients in liver transplantation. *Transplant Proc* 1995; 27: 2332-3.

Sapir L, Martin PY, Giostra E, Niederberger M, Lang U, Capponi A, Hadengue A. Acute effects of nitric oxide synthase inhibition on systemic, hepatic and renal hemodynamics in patients with cirrhosis and ascites. *J Invest Med* 2002 ; 50 ; 116-24.

Schemmer P, Bunzendahl H, Thurman RG, Herfarth Ch, Klar E. Arginine specific proteolytic activity predicts graft survival. Comunicación presentada en The International Congress of the Transplantation Society, Roma, septiembre 2000.

Schirier RW, Niederberger M, Weigert A, Gines P. Peripheral arterial vasodilation: determinant of functional spectrum of cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1994; 14:14-22.

Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system : regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1178 : 153-75.

Scomotau S, Uhlmann D, Loffler BM, Breu V, Spiegel HU. Involvement of endothelin/nitric oxide balance in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 284: 65-70.

Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *AM J Surg* 2001; 181: 160-6.

Shaw BW, Gordon RD, Iwatzuki S, Starzl TE. Hepatic retransplantation. *Transplant Proc* 1985; 17: 264-71.

Sherlock S. Vasodilation associated with hepatocellular disease: relation to functional organ failure. *Gut* 1990; 31: 365-367.

Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Urakami A, Totsuka E, Kishida A, Lee R, Subbotin V, Furukawa H, Starzl TE, Todo S. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 43-52.

Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S, Karahashi T, Kumamoto Y, Yoshida M, Kitajima M. Up-regulation of

oxygen derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1997; 64: 1398-403.

Silvagno F, Xia H, Bredt D. Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 1996; 271: 11204-8.

Smith RE, Robinson NM, McPeake JR, Baylis SA, Charles IG, Heaton ND, Moncada S, Williams R, Martin JF. Induction and role of NO synthase in hypotensive hepatic failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3079-82.

Snover DC, Sibley RK, Freese DK. Orthotopic liver transplantation: pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference of the diagnostic features and natural story of rejection. *Hepatology* 1984; 4: 1212-22.

Southard JH, Marsh DC, McAnulty JF, Belzer FO. Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery*. 1987; 101: 566-70.

Starzl TE, Marchioro TL, Von Kaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of liver humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963; 117: 659-76.

Starzl TE, Marchioro TL, Huntley RT, Rifkind DT, Rowlands DT, Dickson TC, Waddell WR. Experimental and clinical homotransplantation of the liver. *ANN NY Acad Sci* 1964; 120: 739-65.

Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989; 169: 1543-55.

Sugawara Y, Kubota K, Ogura T, Esumi H, Inoue K, Takayama T, Makuuchi M. Increased nitric oxide production in the liver in the perioperative period of partial hepatectomy with Pringle's maneuver. *J Hepatol* 1998; 28: 212-20.

Svensson KL, Persson H, Hendriksson Bakarlberg I, Sonander H, Lundholm K, Stenqvist O, Scherten T. Whole body gas exchange: amino acid and lactate clearance as indicators of initial and early allograft viability in liver transplantation. *Surgery* 1989; 105: 472-80.

Terenzi F, Díaz-Guerra MJM, Casado M, Hortelano S, Leone S, Boscá L. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. *J Biol Chem* 1995; 270: 6017-21.

Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 264-74.

Todo S, Demetris AJ, Makowka L, Teperman L, Podesta L, Shaver T, Tzakis A, Starzl TE. Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* 1989a; 47: 903-5.

Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA* 1989b; 261: 711-4.

Tomasdottir H, Hendriksson BA, Bengston JP, Bengston A, Stenqvist O, Persson H. Complement activation during liver transplantation. *Transplantation* 1993; 55: 799-802.

Uhlmann D, Scommotau S, Witzigmann H, Spiegel HU. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res* 1998; 30: 175-84.

Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Endothelin/nitric oxide balance influences hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: S212-4.

Vallance P y Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337: 776-8.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992 ; 339: 572-5.

Vallance P. The asymmetrical dimethylarginine/dimethyl-arginine dimethylhydrolase pathway in the regulation of nitric oxide generation. *Clinical Science* 2001; 100: 159-60.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9220-5.

Vishwanathan, K., Tackett, R.L., Stewart, J.T., and Bartlett, M.G. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 748: 157-166.

Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145: 1421-3.

Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996; 270: G798-803.

Wall WJ, Mimeault R, Grant DR, Bloch M. The use of older donors livers for hepatic transplantation. *Transplantation* 1990; 49: 2378-82.

Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995; 4: 282-8.

Wang Y, Vodovotz Y, Kim PK, Zamora R, Billiar TR. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 962: 415-22.

Webster NR, Bellamy MC, Lodge JP, Sadek SA. Haemodynamics of liver reperfusion: comparison of two anaesthetic techniques. *Br J Anaesth* 1994 Apr; 72: 418-21.

Welch CS. A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant Bull* 1955; 2: 54-61.

Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225-8

Xia H, Bredt DS. Cloned and expressed nitric oxide synthases proteins. *Methods Enzymol* 1996; 268: 427-36.

Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 1998; 275: G1341-52.

Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, Reid K, Murase N, Geller DA. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology* 2002; 36: 573-81.

Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic/ischemia reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor [kappa]B. *Hepatology* 1999; 30: 203-8.

Zanaro NL, Romero MC, Duek F, Inventarza O, Lendoire J, Sasseti B. Nitric oxide in liver transplantation. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 932-6.

Zetlaoui P, Catoire OP, Gillon MC, Descorps-Declere A. Variations in cardiac output in the early phase of liver declamping in a liver graft. *Ann Fr Anesth Reanim* 1989; 8: R51.

Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4 (+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997; 100: 279-89.

Zweier JL, Samouilov A, Kuppusamy P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochimica Biophysica Acta* 1999; 1411: 250-262.